



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina Veterinaria

Unidad de Posgrado

Evaluación de la respuesta inmune Th₁ y Th₂ en cuyes infectados experimentalmente con una cepa aislada de campo de *Salmonella Typhimurium*

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Salud Animal

AUTOR

David Geiner MEJÍA ZAVALA

ASESOR

Abelardo Lenin MATURRANO HERNÁNDEZ

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Mejía D. Evaluación de la respuesta inmune Th1 y Th2 en cuyes infectados experimentalmente con una cepa aislada de campo de Salmonella Typhimurium [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Unidad de Posgrado; 2018.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMERICA
Facultad de Medicina Veterinaria
UNIDAD DE POSGRADO



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE
MAGÍSTER EN CIENCIAS VETERINARIAS CON MENCIÓN EN SALUD ANIMAL

En el Auditorio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, siendo las 10:30 horas del día lunes 17 de setiembre de 2018, el Jurado Examinador de Tesis de Grado de Magíster, presidido por el Mg. Alberto Manchego Sayán (**presidente**) y constituido por los siguientes miembros: Dr. Abelardo Lenin Maturrano Hernández (**Asesor**), Mg. Siever Miguel Morales Cauti, Mg. Antonio Herrera Rosalino y el Mg. Ronald Jiménez Aliaga, se dio inicio a la sustentación oral y pública de la Tesis intitulada:

“Evaluación de la respuesta inmune Th₁ y Th₂ en cuyes infectados experimentalmente con una cepa aislada de campo de *Salmonella Typhimurium*”, presentado por el Bachiller en Medicina Veterinaria:

DAVID GEINER MEJÍA ZAVALA

Quien sustentó la Tesis para obtener el Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Salud Animal y absolvió satisfactoriamente las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado y practicada la votación obtuvo la calificación de: **MUY BUENO (17) DIECISIETE** _____

A continuación, el Presidente del Jurado recomendó a la Unidad de Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria, proponga el otorgamiento del **Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Salud Animal**, al Bachiller en Medicina Veterinaria: **David Geiner Mejía Zavala**.

Siendo las 12:00 horas del día lunes 17 de setiembre de 2018, se dio por concluido el acto académico, suscribiéndose la presente Acta.

.....
Mg. Alberto Manchego Sayán (P.P.D.E.)
Presidente

.....
Dr. Abelardo Lenin Maturrano Hernández (P.A.T.C)
Miembro (Asesor)

.....
Mg. Siever Miguel Morales Cauti (P.A.T.C)
Miembro

.....
Mg. Antonio Herrera Rosalino
Miembro (Externo)

.....
Mg. Ronald Jiménez Aliaga (P.A.D.E)
Miembro

.....
Dr. Miguel Gavidia Chucán (P.P.D.E.)
Director de la Unidad de Posgrado
Facultad de Medicina Veterinaria
UNMSM



A mi madre.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Lenin Maturrano Hernández y al Dr. Raul Rosadio Alcántara.

Al equipo del Laboratorio de Biología y Genética Molecular: Luis, Guillermo, Jorge, Rocío, Marcos, Raquel, Ana, Dennis, Gerald, Marjorie, Juan, Gerardo, muchas gracias a todos ustedes por el apoyo y colaboración en el laboratorio.

Al Dr. Alfonso Chavera por su apoyo en el análisis histopatológico.

A Maribel, Víctor y Yessenia, mil gracias.

El presente estudio fue financiado por el Programa de Innovación para la Competitividad y Productividad INNÓVATE Perú (FINCyT), proyecto contrato N°362 PNICP-PIAP 2014 “Desarrollo de una vacuna para el control y prevención de la Salmonelosis en la producción de Cuyes”.

The logo for Innóvate Perú features the word "Innóvate" in a large, bold, red sans-serif font. To the right of "Innóvate", the word "Perú" is written in a smaller, grey sans-serif font, oriented vertically.

ÍNDICE

Resumen	i
Abstract	ii
Lista de abreviaturas	iii
Lista de cuadros	iv
Lista de figuras	v
Lista de anexos	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	01
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1 Aspectos históricos.....	03
2.2 Género <i>Salmonella</i>	05
2.3 La crianza del cuy en el Perú.....	09
2.4 Salmonelosis en cuyes.....	10
2.5 Respuesta inmune.....	16
2.5.1 Linfocitos T.....	17
2.5.2 Linfocitos B.....	20
2.5.3 Citoquinas.....	21
2.6 Respuesta inmune innata a la infección por <i>Salmonella</i>	34
2.6.1 Activación temprana de células T en el intestino	35
2.6.2 Inmunidad protectora a la infección con <i>Salmonella</i>	36
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
4. RESULTADOS.....	45
4.1 PCR en tiempo real.....	45
4.2 Histopatología.....	54
5. DISCUSIÓN.....	63
6. CONCLUSIONES.....	71
7. LITERATURA CITADA.....	72
8. ANEXOS.....	81

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la expresión relativa de las citoquinas involucradas en la respuesta inmune Th1 (IL-2, IL-12, IFN- γ , TNF- α) y Th2 (IL-4, IL-10 y TGF- β) en 21 cuyes (*Cavia porcellus*) inoculados experimentalmente con una cepa aislada de campo de *Salmonella* Typhimurium a una dosis de 10^2 UFC/ml vía intraperitoneal y 7 cuyes inoculados con la misma cepa inactivada (grupo control). Se utilizó animales destetados de 15-30 días de edad, sin importar sexo y clínicamente sanos, todos mantenidos en las mismas condiciones en el bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Se agruparon los cuyes en 4 pozas (A, B, C y D) y cada poza con 7 animales cada uno, además se colocaron 2 cuyes centinelas no inoculados. La toma de muestras de sangre y tejidos se realizó los días 1, 3, 5, 7, 9, 15 y 30 post-inoculación, siendo colectados 3 individuos del grupo tratamiento y 1 del grupo control. El aislamiento de los leucocitos sanguíneos se realizó por la técnica del gradiente de Ficoll y la extracción del ARN total de éstas células mediante el uso de Trizol. El ADNc fue sintetizado a partir de las muestras de ARN y luego se desarrolló la PCR en tiempo real con “primers” específicos para las citoquinas en estudio. La expresión relativa fue determinada por el método comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ a fin de evaluar la expresión de los ARNm de las citoquinas analizadas con respecto al calibrador (cuy sano), usando como gen constitutivo de referencia al GAPDH. Las expresiones de los genes de todas las citoquinas mostraron un aumento con respecto a los calibradores y un incremento con mayor intensidad con respecto a las expresiones de los cuyes del grupo control; además, una cinética ascendente con respecto a los días post-inoculación, los primeros días hubo predominio de las expresiones del perfil Th1, posteriormente ambas aumentan con predominio final de las citoquinas de la respuesta inmune Th2. El análisis histopatológico y el aislamiento se realizó para confirmar la infección y los animales mostraron las lesiones características de salmonelosis, siendo el hígado el órgano afectado con mayor frecuencia.

Palabras clave: Cuy, *Salmonella* Typhimurium, Linfocitos Th1, Linfocitos Th2, Citoquinas.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the relative expression of the cytokines involved in the Th1 immune response (IL-2, IL-12, IFN- γ , TNF- α) and Th2 (IL-4, IL-10 and TGF- β) in 21 guinea pigs (*Cavia porcellus*) inoculated experimentally with a field isolate of *Salmonella* Typhimurium at a dose of 10^2 CFU/ml intraperitoneally and 7 guinea pigs inoculated with the same inactivated strain (control group). Weaned animals of 15-30 days of age were used, regardless of sex and clinically healthy, all kept under the same conditions in the veterinary medicine faculty of the National University of San Marcos. The guinea pigs were grouped in 4 pools (A, B, C and D) and each pool with 7 animals each, in addition 2 guinea pigs not inoculated were placed. Blood and tissue samples were taken on days 1, 3, 5, 7, 9, 15 and 30 post-inoculation, with 3 individuals from the treatment group and 1 from the control group being collected. The isolation of the blood leukocytes was performed by the Ficoll gradient technique and the extraction of the total RNA from these cells by the use of Trizol. The cDNA was synthesized from the RNA samples and then the PCR was developed in real time with specific "primers" for the cytokines under study. The relative expression was determined by the comparative method $2^{-\Delta\Delta C_t}$ in order to evaluate the expression of the mRNAs of the analyzed cytokines with respect to the calibrator (healthy guinea pig), using GAPDH as a reference constitutive gene. The expressions of the genes of all the cytokines showed an increase with respect to the calibrators and an increase with greater intensity with respect to the expressions of the guinea pigs of the control group; in addition, an ascending kinetic with respect to the days post-inoculation, the first days there was predominance of the expressions of the Th1 profile, later both increase with final predominance of the cytokines of the Th2 immune response. The histopathological analysis and the isolation was performed to confirm the infection and the animals showed the characteristic lesions of salmonellosis, with the liver being the most frequently affected organ.

Key words: *Cavia porcellus*, *Salmonella* Typhimurium, Th1 lymphocytes, Th2 lymphocytes, Cytokines.

LISTA DE ABREVIATURAS

APC: Células Presentadoras de Antígenos
ARN: Ácido Ribonucleico
CD: Célula Dendrítica.
GALT: Tejido Linfoide Asociado al Intestino
GM-CSF: Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos
EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético.
IFN- γ : Interferón gamma
Ig: Inmunoglobulina
IL: Interleucina
ILC: Células Linfoides Innatas
IP: Intraperitoneal
IRF4: Factor Regulador de Interferón
JAK: Janus Quinasas
JNK: Quinasa Terminal
LB: Linfocito B
LT: Linfocito T
MAP: Mitogen Activated Protein
MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MIP: Proteína Inflamatoria de Macrófagos
ORF: Marcos Abiertos de Lectura
PBS: Tampón Fosfato Salino
STAT: Proteínas de Transducción de Señal y Activador de la Transcripción
Ta: Temperatura de annealing
Td: temperatura de denaturación
Te: Temperatura de extensión
TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante
Th: Linfocito T helper o colaborador
T3SS-1: Sistema de Secreción tipo III – 1

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Título	Pág.
1	Clasificación del género <i>Salmonella</i>	05
2	Cebadores de citoquinas utilizados, tamaño y referencia	42
3	Componentes para la qPCR	42
4	Condiciones para la qPCR según gen a evaluar	43
5	Valores Cq del gen GAPDH según días post-inoculación	45
6	Histopatología del intestino delgado	54
7	Histopatología del linfonódulo mesentérico	56
8	Histopatología del hígado	57
9	Histopatología del bazo	59
10	Histopatología del pulmón	60
11	Histopatología del cerebro	61

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Pág.
1	Antígenos de superficie de <i>Salmonella</i> Typhimurium y <i>S. Typhi</i>	06
2	Hepatitis necrótica multifocal causada por <i>Salmonella</i>	11
3	Mecanismos “Trigger” y “Zipper” usados por <i>Salmonella</i>	13
4	Microfotografía electrónica que demuestra la invasión de las células epiteliales del íleon en cobayos por <i>Salmonella</i> Typhimurium	14
5	Biogénesis de la SCV dentro de la célula hospedadora	15
6	Respuesta inmunológica en el intestino contra <i>Salmonella</i>	35
7	Expresión relativa de TNF- α según días post-inoculación	46
8	Expresión relativa de IFN- γ según días post-inoculación	47
9	Expresión relativa de IL-2 según días post-inoculación	48
10	Expresión relativa de IL-12 según días post-inoculación	49
11	Expresión relativa de IL-4 según días post-inoculación	50
12	Expresión relativa de IL-10 según días post-inoculación	51
13	Expresión relativa de TGF- β según días post-inoculación	52
14	Expresión relativa de IL-17 según días post-inoculación	53
15	Intestino delgado día 5 y 30 post-inoculación	55
16	Linfonódulo mesentérico día 7 y 15 post-inoculación	56
17	Hígado día 1 y 3 post-inoculación	58
18	Hígado día 7 y 30 post-inoculación	58
19	Bazo día 5 y 30 post-inoculación	59
20	Pulmón día 7 y 15 post-inoculación	60
21	Cerebro día 5 y 7 post-inoculación	62
22	Cerebro 15 y 30 post-inoculación	62

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1	Recuento de <i>Salmonella</i> en heces post-infección	81
ANEXO 2	Aislamiento en Agar XLD	82
ANEXO 3	Resultados de la PCR en tiempo real	83

INTRODUCCIÓN

El cuy (*Cavia porcellus*) es un mamífero roedor con origen aproximadamente hace 2500-3600 de años. Es criado en la gran mayoría de hogares peruanos, especialmente en las zonas altoandinas (Bustamante, 1993). Es una especie consumida tradicionalmente por el poblador andino, además de ser la base de su economía doméstica; pues la especie tiene grandes cualidades alimenticias y productivas. El cuy es un animal rústico, de ciclo de vida corto, por lo que puede ser criado a bajo costo (Ordoñez, 2003). Por ello, en los últimos años ha crecido el área de producción y explotación como animal de beneficio para el consumo humano. Se considera que la población de cuyes en nuestro país asciende a más de 12 millones (INEI Censo 2012).

La salmonelosis representa una gran amenaza a la producción de cuyes. Es una enfermedad con altos índices de mortalidad y morbilidad, principalmente en las crías al post-destete, con impacto negativo en la producción (Chauca, 1997). Para que ocurra la enfermedad, el proceso de infección debe seguir ciertos pasos de adhesión, invasión, maduración y diseminación sistémica. En todas estas fases, el microorganismo deberá sobreponerse al sistema inmune del hospedero (Dorman, 2009). Esta adaptación ocurre debido a una coordinada expresión de múltiples genes en respuesta a señales específicas presentes en el hospedero (Majdalani y Gottesman, 2005; Stock *et al.*, 2000). *Salmonella* ha desarrollado mecanismos para evadir la defensa inmune y causar infección crónica en el huésped. La respuesta inmune del huésped implica componentes innatos y adaptativos que son diferencialmente activos en tejidos linfoides sistémicos y de la mucosa. Se ha demostrado que las células T CD4 juegan un papel importante en la inmunidad protectora durante la infección primaria y secundaria. Estas células T CD4 se activan inicialmente en las placas de Peyer y nódulos linfáticos mesentéricos después de la infección, antes de que se produzca una estimulación adicional en los tejidos sistémicos. Además de las células T CD4, las células inmunes innatas, las células T CD8 y las células B contribuyen de forma importante en la eliminación del patógeno.

La salmonelosis tiene el potencial de causar altas tasas de mortalidad en la población de cuyes, ocasionando severas pérdidas económicas en los productores. (Chauca, 1997). Es una enfermedad que representa el 61-95% de la mortalidad en la crianza de cuyes (Matsuura, 2008). *Salmonella* Typhimurium en roedores produce una infección sistémica y una enfermedad similar a la observada en humanos después de la infección con *S. Typhi*. El sistema inmune innato puede restringir la replicación de *S. Typhimurium* hasta cierto punto, pero para el control efectivo y la erradicación de las bacterias, la inmunidad adquirida es esencial. La infección por *Salmonella* induce la generación de células T CD4+ y CD8+ específicas, y ambas poblaciones de células T son importantes para la protección durante las respuestas primarias y secundarias, aunque los mecanismos subyacentes a la protección mediada por las células T aún no se conocen por completo. La respuesta a *S. Typhimurium* implica inmunidad mediada por células T y B, y los mecanismos mediados por ambas poblaciones de linfocitos son importantes para el control de la infección primaria y la protección contra la infección secundaria (Mittrücker y Kaufmann, 2000).

El conocimiento de la respuesta inmune en cuyes contra *Salmonella* es de gran utilidad para el manejo y control de la enfermedad en esta especie susceptible. Por ello, el objetivo del estudio es evaluar la respuesta inmune a la infección de *Salmonella* Typhimurium en cuyes inoculados *in vivo*. A través de una infección experimental, se pretende evaluar la expresión de citoquinas de la respuesta inmune Th₁ y Th₂. Esta evaluación *in vivo* forma parte de la elaboración de una vacuna de última generación para la prevención de salmonelosis en cuyes.

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS

Mucho antes que se descubriera al bacilo causante de la salmonelosis, ya se había asumido que la condición se encontraba relacionada a la presencia de un microorganismo. Junto a sus colegas, trataron de demostrar que la diseminación de la enfermedad se encontraba relacionada al agua de bebida contaminada con excremento de pacientes con “fiebre” tifoidea (Liebermeister, 1896). William Budd, un doctor en Bristol que se interesó mucho en el estudio del cólera y fiebres entéricas, demostró en 1873, que la fiebre tifoidea se podía transmitir por una toxina específica presente en excrementos y que la contaminación de agua con heces de pacientes era la responsable de la propagación. De acuerdo con Budd, todos los casos estaban relacionados con un caso anterior. Fue catalogado como un líder en el estudio de la interacción de los seres humanos consigo mismos, con organismos vivos y dentro de ambientes compartidos, siendo la meta de la ecología humana. Desde entonces, un gran número de doctores y científicos intentaron descubrir la naturaleza del microorganismo responsable de la enfermedad y encontraron gran dificultad en aislar el bacilo (Moorhead, 2002). Fue Karl Joseph Eberth, doctor y estudiante de Rudolf Virchow, quien en 1879 observó por primera vez el bacilo en los nódulos abdominales y el bazo de individuos infectados. Sus observaciones fueron publicadas en 1880. Su descubrimiento fue verificado y confirmado por bacteriólogos alemanes e ingleses, incluido Robert Koch. Sin embargo, no pudo aislar al microorganismo por carecer de los materiales necesarios y pericia, que se encontraba disponible en un número limitado de laboratorios (Keating, 1892). Fue Georg Theodor August Gafky en 1884, un discípulo de Robert Koch, quien aisló el bacilo y lo nombró *Eberthella typhi*, aunque también fue conocido como el bacilo Gafky-Eberth (Robinson, 1970). En 1885, se conoció a una bacteria similar, que causaba enfermedad entérica en humanos y animales de granja. Esto fue probado por Daniel E. Salmon y Theobald Smith, quienes reportaron el aislamiento de la bacteria responsable del cólera porcino. El nombre

Salmonella fue tomado en honor al patólogo veterinario Daniel E. Salmon (Oldenkamp, 2004).

2.1.1 María la Tifosa

María Mallon (conocida como María Tifoidea o María la Tifosa) nació en Irlanda en 1869 y migró a los Estados Unidos en 1883. Fue contratada como cocinera en 1906 por Charles Henry Warren, un banquero dueño de una residencia en Oyster Bay en la costa norte de Long Island. Desde el 27 de agosto y 3 de setiembre de ese año, 6 de las 11 personas presentes en la casa sufrieron fiebre tifoidea. En esos días, la fiebre tifoidea era una enfermedad fatal en un 10% de los casos debido a que el conocimiento acerca de su transmisión era escaso y no existían aún los antibióticos (Brooks, 1996). Antes de trabajar en Oyster Bay, en las residencias y casas donde trabajó como cocinera muchas personas sufrieron enfermedad, pero al ser conocida como una mujer sana y robusta, nunca fue asociada su presencia con la aparición de casos de fiebre tifoidea. Sin embargo, el caso de Oyster Bay fue investigado de manera exhaustiva por George Sober. Toda su investigación fue relatada en su publicación titulada “El curioso caso de portador de María la Tifosa”. Sober descubrió e identificó por primera vez en la historia a un portador sano de *Salmonella*, María Mallon, capaz de albergar a la bacteria, contaminando todo a su alrededor, siendo una verdadera amenaza para el ambiente y la sociedad de la época. Pero según relata George Sober, lograrlo no fue tarea fácil. María Mallon se opuso a recibir tratamiento y escapó de las autoridades sanitarias cuando determinaron que constituía un foco de infección. Contaminó y fue causa de infección en más de 40 personas, causando dos muertes hasta esa fecha. Un tiempo después fue encontrada, capturada y puesta en cuarentena por las autoridades. En noviembre de 1938 falleció por neumonía, falla renal y cardíaca. Así fue como María Mallon, se convirtió en el primer caso de portador asintomático en los Estados Unidos, y se probó que fue responsable de la contaminación de al menos 122 personas, incluidas 5 muertes (Soper, 1939).

2.2 El género *Salmonella*

El género *Salmonella* está incluido en la familia *Enterobacteriaceae*. Se caracterizan por ser bacilos Gram negativos, móviles por flagelos peritricos (excepto *Salmonella gallinarum* y *Salmonella pullorum*), anaerobios facultativos, no esporulados. No fermentan la lactosa (excepto *Salmonella arizonae* y *Salmonella diarizonae*), fermentan glucosa con producción de gas (excepto *Salmonella* Thypi), la mayoría producen H₂S, son oxidasa negativos, catalasa positivos, indol, urea y Voges Proskauer negativos, Citrato de Simmons positivo, descarboxilan la lisina y la ornitina. La mayoría son patógenos para los humanos, sin embargo, pueden ser patógenos para otros hospedadores como mamíferos, aves, reptiles, anfibios e incluso plantas por lo que son conocidos como “patógenos universales”, por su amplio rango de hospedadores (Grimont y Weill, 2007).

Se divide en dos especies *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*, tomando en cuenta sus características bioquímicas generales. Esta última se subdivide en seis subespecies: *S. enterica*, *S. salamae*, *S. arizonae*, *S. diarizonae*, *S. indica* y *S. houtenae* (Cuadro 1). Las salmonelas de mayor importancia médica pertenecen a las subespecies *enterica* (Figuroa y Verdugo, 2005). El género *Salmonella* está a su vez, está dividido por serología en serovariedades, mediante el esquema de Kauffman-White. Actualmente, existen más de 2610 serovariedades de *Salmonella* reconocidas en todo el mundo, y casi todas son capaces de causar enfermedad en humanos y animales (Figuroa y Verdugo, 2005; Guibourdenche *et al.*, 2010).

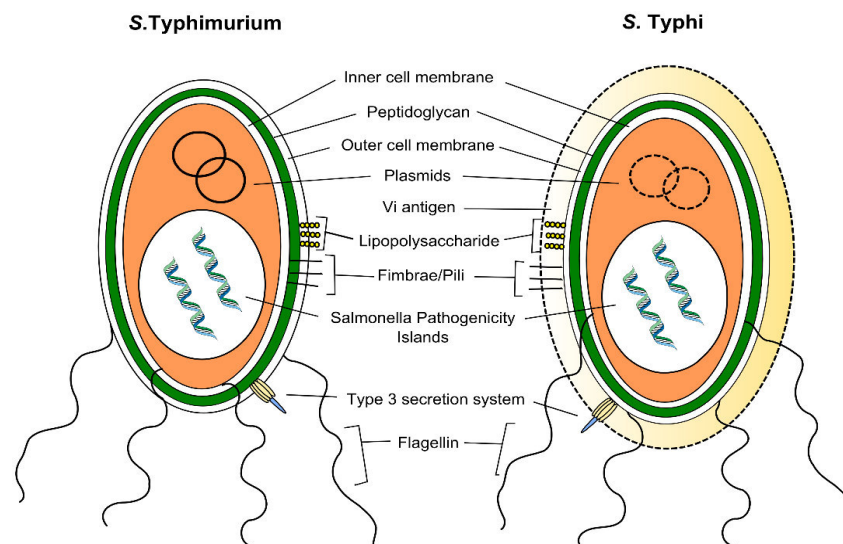
Cuadro 1. Clasificación del género *Salmonella*.

Especies	Subespecies	N° de serovariedades	Principales hábitats
<i>Salmonella enterica</i>	subesp. <i>enterica</i> (I)	1531	Animales de sangre caliente
	subesp. <i>salamae</i> (II)	505	Animales de sangre caliente/fría y ambiente
	subesp. <i>arizonae</i> (IIIa)	99	Animales de sangre fría y ambiente
	subesp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	336	Animales de sangre fría y ambiente
	subesp. <i>houtenae</i> (IV)	73	Animales de sangre fría y ambiente
	subesp. <i>indica</i> (VI)	13	Animales de sangre fría y ambiente
<i>Salmonella bongori</i>	(antes Subespecie V)	22	Animales de sangre fría y ambiente
Total		2579	

2.2.1 Estructura antigénica

La estructura antigénica de *Salmonella* spp., es similar a otras enterobacterias, presenta: Antígeno O, Antígeno H y Antígeno Vi. La envoltura externa de las bacterias del género *Salmonella* está compuesta por 3 capas: la membrana interna, la pared de peptidoglucano y la membrana externa (Brock, 1999). Ésta última, ampliamente estudiada está compuesta por fosfolípidos, lipopolisacáridos (LPS) y proteínas (Figura 1). El LPS está compuesto de un lípido A embebido en la membrana externa, una región central, y una región antigénica O. El antígeno O, llamado también antígeno somático, está compuesto por complejos de fosfolípidos y polisacáridos, su composición es aproximadamente 60% polisacáridos, 20-30% lípidos y 3,5-4% hexosamina. Se encuentra en todas las bacterias gramnegativas. (Brock, 1999). La cadena de polisacáridos del Ag O es un polímero de unidades repetidas de oligosacáridos (de 3 a 5 azúcares) lineales o ramificados. La naturaleza de los grupos terminales y el orden en que se encuentran las unidades repetidas de la cadena determina la especificidad antigénica de la bacteria. Como esta estructura difiere ampliamente entre las distintas serovariedades, hay diferencias en la especificidad antigénica O (Caffer *et al.*, 2008).

Figura 1. Antígenos de superficie de *Salmonella* Typhimurium y *S. Typhi* (Jong *et al.*, 2012)



La mayoría de serotipos de *Salmonella* son móviles, debido a la presencia de flagelos. Estos, son una estructura compleja que consiste en un cuerpo basal, un segmento de unión (hook) y un filamento. El cuerpo basal ancla el flagelo a la envoltura de la célula y el “hook” une el cuerpo basal con el filamento, constituido por flagelina, una proteína de alto peso molecular. El antígeno flagelar es conocido como antígeno H. Generalmente las bacterias del género *Salmonella* poseen dos fases flagelares (difásicos) diferenciables por medio de aglutinación. Las bacterias que sólo expresan una fase son denominadas monofásicas. La expresión de estas fases (Fase 1 o Fase 2), depende de los genes estructurales que posean (Parra, *et al.*, 2002).

Las bacterias del género *Salmonella* carecen de una cápsula propiamente dicha. En su lugar, existe el Antígeno Vi, presente únicamente en 3 serovariedades: *Salmonella* Typhi, *S. Paratyphi*, y algunas cepas de *S. Dublin* (Raffatellu *et al.*, 2006).

2.2.2 Salmonelosis: infección y rango de hospedadores

Las serovariedades de *Salmonella* se pueden dividir en restringidas por el huésped, específicas del huésped y generales, con importantes implicaciones para la epidemiología y la salud pública (Uzzaeu *et al.*, 2000). Las serovariedades específicas del hospedador, por ejemplo Paratyphi A, Gallinarum, Pullorum o Typhi solo causan enfermedad en una sola especie (Baumler *et al.*, 1998; Uzzaeu *et al.*, 2000). Por lo contrario, los serovares restringidos del hospedador se asocian predominantemente con una especie, pero también pueden causar enfermedad en otras especies (Uzzaeu *et al.*, 2000). *Salmonella* Dublin, por ejemplo, está adaptada al ganado, pero también se han documentado infecciones en pequeños rumiantes, cerdos y humanos. Otro ejemplo, el serovar Choleraesuis está adaptado a los cerdos, pero también se ha aislado de otras especies (Smith y Jones, 1967; Olsen y Skov, 1994). Los serovares generales como *Salmonella* Typhimurium comúnmente causan enfermedades en una amplia gama de huéspedes, aunque se ha descrito un rango de huéspedes estrecho para ciertos subtipos, por ejemplo, los subtipos Typhimurium DT2 y DT99, que parecen estar adaptados a las

palomas (Gyles et al., 2010). Los serovares con un rango de hospedadores amplio y estrecho parecen diferir en la manifestación clínica, aunque otros factores como la especie hospedadora, la edad y la enfermedad concomitante también afectan la manifestación clínica (Gyles et al., 2010). Las infecciones con serovares generales a menudo se caracterizan por una alta morbilidad pero baja mortalidad, y los síntomas gastrointestinales son la manifestación clínica predominante. Por el contrario, las infecciones con serovares adaptados o restringidos del huésped, como Choleraesuis, Abortusequi, Gallinarum o Pullorum se caracterizan típicamente por una baja morbilidad y alta mortalidad, y la enfermedad sistémica es frecuente (Uzzaeu *et al.*, 2000; Gyles et al., 2010).

Los serovares de *Salmonella* claramente parecen diferir en su potencial patogénico para los seres humanos y su distribución varía enormemente entre poblaciones humanas y animales, así como entre diferentes poblaciones de animales en la misma área geográfica. Por ejemplo, aproximadamente el 40% de todos los serovares de *Salmonella* conocidos se asocian predominantemente con reptiles o anfibios, aunque menos del 1% de los casos de salmonelosis humana son causados por estos serovares asociados a reptiles (Kyngsley *et al.*, 2000).

Majowicz et al. (2010) estimaron que aproximadamente de 80.3 de 93.8 millones de casos de gastroenteritis relacionada con *Salmonella* humana que se estima ocurren globalmente cada año son transmitidos por los alimentos, lo que representa aproximadamente 86% de los casos de salmonelosis humana. Otro estudio basado en la obtención formal de la opinión de expertos estimó que aprox. 55% (rango 32-88%) de los casos de *Salmonella* humana son transmitidos por los alimentos, 14% (rango 3-26%) están relacionados con el viaje, 13% (rango 0-29%) se adquieren a través de fuentes ambientales, 9% (rango 0-19%) se producen debido a la transmisión directa de humano a humano y el 9% (rango 0-19%) son atribuibles al contacto directo con animales (Vargas-Galindo, 2007).

2.3 La crianza del cuy en el Perú

El cuy (cobayo o curí) es un mamífero roedor originario de la zona andina de Bolivia, Colombia, Ecuador y Perú. El cuy constituye un producto alimenticio de alto valor nutricional que contribuye a la seguridad alimentaria de la población rural de escasos recursos. En los países andinos existe una población estable de más o menos 35 millones de cuyes. Las investigaciones realizadas en el Perú desde la década del 60 han servido de marco de referencia para considerar a esta especie como productora de carne. Entre las especies utilizadas en la alimentación del hombre andino, sin lugar a dudas el cuy constituye el de mayor popularidad y en la actualidad tiene múltiples usos (mascotas, animal experimental), aunque en los andes sigue siendo utilizado como un alimento tradicional (Chauca, 1997). Las últimas estadísticas señalan que Perú cuenta con una población de 16 millones de cuyes, sin embargo se considera que hay sectores donde se crían estos animales y no han sido registrados por lo que estima que la población real ascendería a 22 millones. Las regiones donde se desarrolla más la crianza de cuyes es la sierra norte (Cajamarca, Lambayeque y La Libertad), seguida de la sierra centro y en menor medida en sierra sur (Chauca, 2016).

La importancia del cuy como especie, radica en sus enormes posibilidades de constituirse en una rentable actividad económica; capaz de permitir utilidades comparativamente superiores a las generadas por otras actividades pecuarias. La creciente demanda de su carne, la posibilidad de mejoramiento genético, permite vislumbrar nuevas perspectivas de desarrollo competitivo de esta especie en el mercado. La carne de esta especie posee grandes propiedades nutricionales. Destaca por su bajo contenido en grasa (10%) y colesterol (65mg/100g) y su alto contenido proteico (20.3%). Sumado a ello, el cuy es un animal rústico y de fácil crianza (Gil, 2007). Lamentablemente, su crianza atraviesa diversos problemas sanitarios. Las causas de mortalidad más comunes son las infecciones bacterianas: neumonía causada por *Streptococcus pneumoniae*, bronconeumonía causada por *Bordetella bronchiseptica*, pseudotuberculosis causada por *Yersinia pseudotuberculosis*, linfadenitis causada por *Streptococcus zooepidemicus* y la salmonelosis,

siendo esta última la enfermedad que causa mayores índices de mortalidad y morbilidad, principalmente en lactantes y destetados (Chauca, 1997).

2.4 Salmonelosis en cuyes

2.4.1 Epidemiología

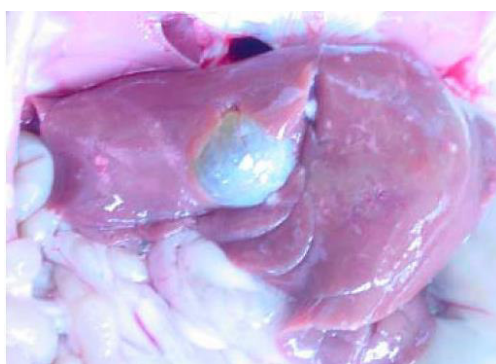
Salmonella es una bacteria de amplia distribución. En el Perú, ha sido aislada como agente causal de salmonelosis en cuyes en diversas regiones. En la Costa (Barranca hasta Chilca), en la Sierra (Valle del Mantaro, entre otros) y la Selva (Chanchamayo) (Aliaga, 1995). La salmonelosis en cuyes es causado bacterias del género *Salmonella*. En nuestro país, la serovariedad aislada con mayor frecuencia es Typhimurium en porcentajes que superan el 95%. Otros serotipos aislados causantes de esta enfermedad son *S. Enteritidis*, *S. Florida*, *S. Bredeney*, *S. Dublin*, *S. Ochiugo*, *S. Limite* (Ameghino, 1968; Ramirez, 1972; Bustamante, 1993; Garmendia, 2000). La salmonelosis en cuyes se puede manifestar en forma aguda y crónica. La forma aguda se caracteriza por un cuadro septicémico y muerte en 24-48 horas. Muchas veces, esta manifestación no presenta signos clínicos debido a la rapidez de su progresión. Puede observarse: decaimiento, postración, anorexia, opistótonos, parálisis de miembros posteriores, diarrea mucosa y abortos. En la manifestación crónica de la enfermedad se observa un adelgazamiento paulatino, pelaje hirsuto y distensión abdominal (Evans, 2005). Los cuadros crónicos son los casos más comunes y su presentación indica que *Salmonella* se encuentra establecida en la granja. El tipo de presentación dependerá del serotipo y cepa de la *Salmonella*; sin embargo, el cuy también presenta un estado latente en el cual no presenta manifestaciones clínicas de ello hasta que sea sometido a situaciones de estrés (Ganaway, 1976; Bunte; 1996).

2.4.2 Lesiones

En la forma aguda, las lesiones implican al hígado, bazo, tejidos linfoides y el intestino (aumento de tamaño, congestión, abscesos y necrosis focal). En el tracto gastrointestinal puede haber aumento de gas y líquido, además de

disminución del grosor de la pared intestinal. Las lesiones en casos subagudos a crónicos pueden demostrar focos necróticos amarillentos en el hígado y demás vísceras, con hiperemia, hiperplasia de las placas de Peyer, hepatomegalia, esplenomegalia y pulmones congestionados. En el tracto reproductivo puede haber focos necróticos en el miometrio y abortos. Una lesión frecuentemente observada es la presencia de pseudomembranas en la superficie hepática, ofreciendo el cuadro de perihepatitis, con la vesícula biliar distendida y llena de líquido (Parra et al., 2002; Figueroa y Verdugo, 2005). Microscópicamente, se puede apreciar esplenitis y linfadenitis con áreas de necrosis rodeadas de células mononucleares y neutrófilos (nódulos paratifoideos). En el hígado puede haber además una hepatitis granulomatosa focal o multifocal, esta lesión se encuentra en diversos grados de evolución, reconociéndose a las fases de reparación (fase proliferativa de la inflamación) como granuloma hepático; en los animales lactantes se puede observar cambio graso y congestión hepática. El hígado es el órgano con mayor frecuencia de lesiones, seguido por el intestino, pulmón y bazo (Ameghino, 1968; Layme, 2009) (Figura 2).

Figura 2. Hepatitis necrótica multifocal causada por *Salmonella* (Layme et al., 2009).



2.4.3 Mecanismo de infección

La infección inicia con la ingestión de estos microorganismos en agua y alimentos contaminados. Después de ser ingeridos con alimentos contaminados, las *Salmonella* llegan a la luz intestinal donde tienen que

competir con la microbiota intestinal residente en busca de nutrientes. *Salmonella* posee la habilidad de percibir ambientes de bajo pH y de responder a ese estrés, crucial para su supervivencia y patogenicidad (Ryan *et al.*, 2015).

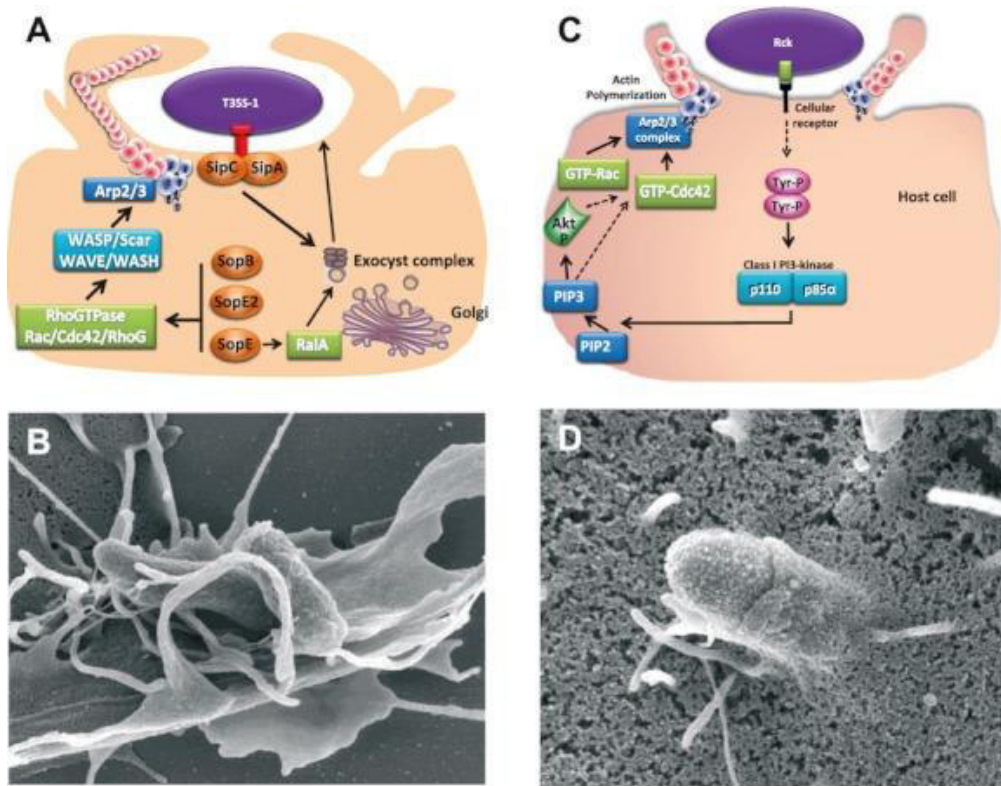
Después de entrar al intestino delgado, las salmonelas alcanzan la capa de mucus intestinal. Las bacterias comensales proporcionan resistencia a la colonización y es una barrera importante, pero a menudo olvidada para la infección por patógenos entéricos. En estudios realizados en modelos murinos, *Salmonella* parece adherirse preferentemente a las células M de las placas de Peyer (PP) en el epitelio intestinal, aunque también se ha reportado invasión en enterocitos (Fabrefa y Vila, 2013). Hay dos componentes principales para las infecciones de *Salmonella* en el intestino: adherencia e invasión subsiguiente. Varias adhesinas y fimbrias son necesarias para mediar en la adherencia a las células epiteliales en el intestino. Después de la adherencia, *Salmonella* puede usar varios mecanismos diferentes para cruzar el epitelio intestinal. *Salmonella* también puede inducir su internalización en enterocitos no fagocíticos (Figura 3) mediante un sistema de secreción tipo 3 codificado en la Isla 1 de la patogenicidad de *Salmonella* (SPI-1).

También se ha propuesto que la invasión se produce por vías paracelulares tras la disrupción de las uniones estrechas o mediante macrófagos/DC CX3CR1+, que se intercalan entre las células epiteliales, la importancia de estas vías alternativas independientes de la invasión aún no se ha determinado. La monocapa epitelial media interacciones entre los desencadenantes de la respuesta inmune y el tejido linfoide asociado a intestino (GALT: gut-associated lymphoid tissue).

El intestino mantiene un sistema inmune altamente activo. Las células M forman parte del GALT y constantemente transportan bacterias y antígenos del lumen al tejido linfoide adyacente, actuando como centinelas del epitelio intestinal (MacDonald y Monteleone, 2005). En roedores, las células M parecen ser una ruta clave para la invasión por *Salmonella* (Hallstrom y

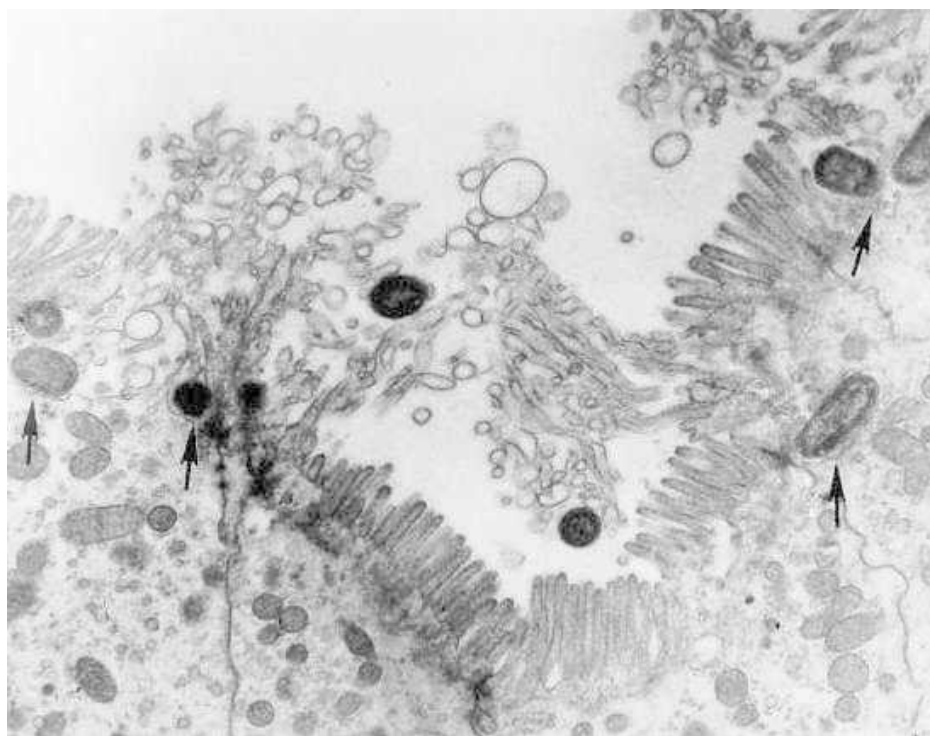
McCormick, 2011). En modelos murinos, el pasaje de las bacterias a través de la pared intestinal es iniciado por transocitosis sea por células M o enterocitos, migración basolateral y exocitosis en el espacio intersticial de la lámina propia (Muller *et al.*, 2012) (Figura 4).

Figura 3. Mecanismos “Trigger” y “Zipper” usados por *Salmonella* para ingresar a las células (Han *et al.*, 2011).



(A) Representación esquemática del mecanismo “Trigger”: mediante el uso de un T3SS-1, ingresan los efectores (SipA, SipC, SopB, SopE, SopE2) ingresan directamente. SopE, SopE2 y SopB activan las RhoGTPasas Rac/Cdc42/RhoG y permite la remodelación de actina del citoesqueleto, vía proteínas celulares: WASP/Scar/WAVE/WASH los cuales activan Arp2/3. En contraste, SipA y SipC se unen directamente a la actina. Para inducir la formación de “ruffles” de membrana e internalización, SipC y SopE vía proteína Ras RalA, reclutan el complejo de exocitosis. (B) Microscopía electrónica de barrido del mecanismo “Trigger”. (C) Representación esquemática del mecanismo “Zipper”: la invasina Rck es expresada en la membrana externa de *Salmonella* e interactúa con el receptor de la membrana celular, llevando a una fosforilación de tirosina quinasa. La activación de PI 3-quinasa induce la formación de PI (3,4,5) P3, que participa en la activación de Akt. La activación de la GTPasa Rac1 conduce a la polimerización de actina mediante el complejo nucleador Arp2/3. (D) Microscopía electrónica de barrido del mecanismo “Zipper”.

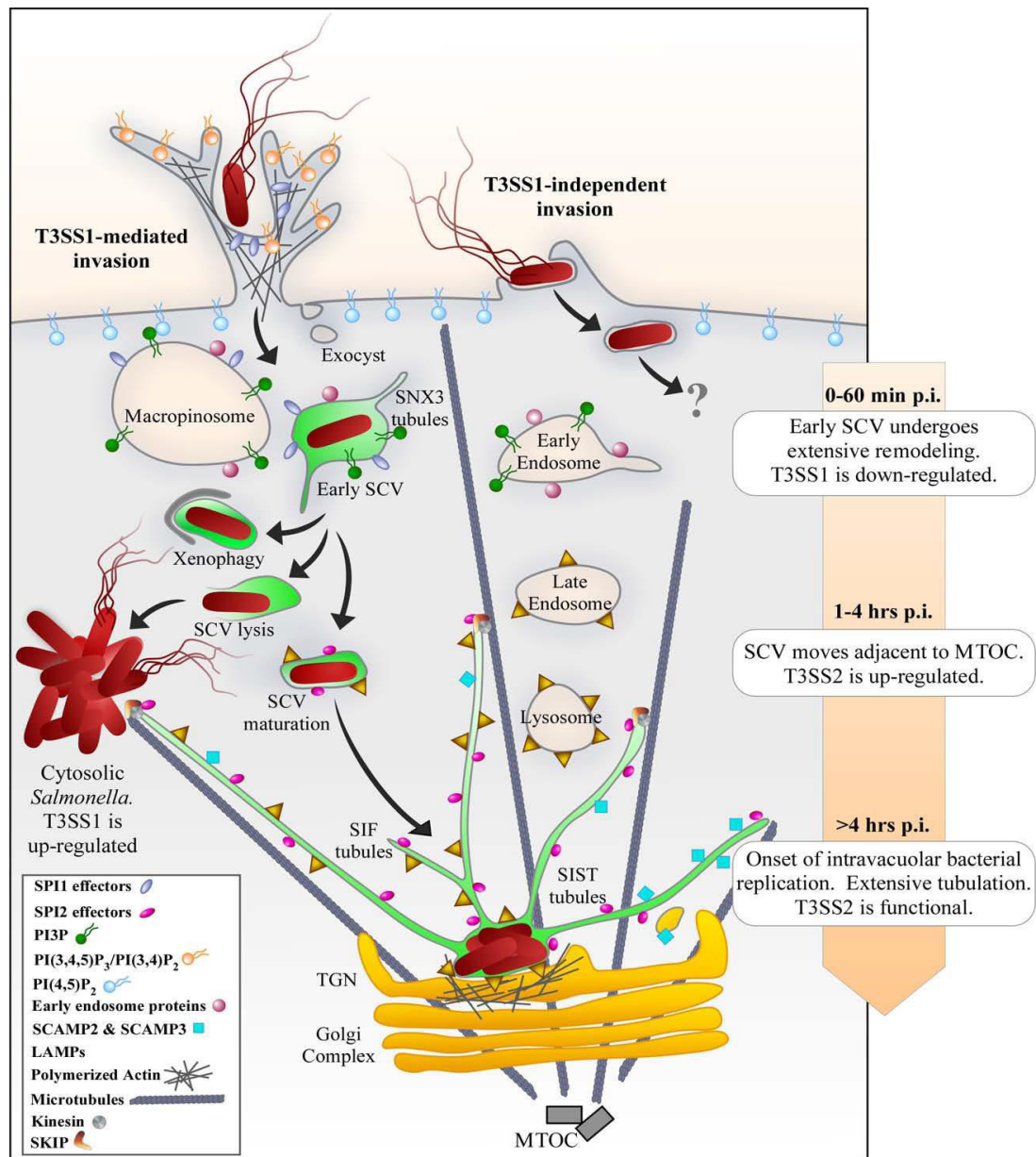
Figura 4. Microfotografía electrónica que demuestra la invasión de las células epiteliales del íleon en cobayos por *Salmonella* Typhimurium. Las flechas señalan las salmonelas invasoras (Giannella, 1996).



Adicionalmente, se ha reportado la captación directa por fagocito CD18+ y CD11b⁺, CD11c⁺, CX₃CR1^{high} (Vásquez-Torres *et al.*, 1999; Muller *et al.*, 2012). Dentro de la lámina propia, *Salmonella* Typhimurium es captada rápidamente por fagocitos (mononucleares) y se disemina por los vasos linfáticos a través de los nódulos linfáticos mesentéricos y el torrente sanguíneo al bazo e hígado (Salcedo *et al.*, 2001).

Una vez fagocitadas, *Salmonella* se replica dentro de un compartimento vacuolar en el citoplasma. Crucial para esta fase intracelular es un segundo sistema de secreción de tipo 3 codificado por una segunda isla de patogenicidad (SPI-2) (Figura 5). Mientras que las cepas no tifoideas permanecen restringidas al tracto gastrointestinal, las serovariedades tifoideas de *Salmonella* se diseminan desde el tracto gastrointestinal a los ganglios linfáticos mesentéricos y colonizan los sitios sistémicos, como el hígado y el bazo (Broz *et al.*, 2012).

Figura 5. Biogénesis de la SCV (*Salmonella*-containing vacuole) dentro de la célula hospedadora (Malik-Kale *et al.*, 2011).



Existen efectores de T3SS-1 que están presentes en la membrana de la SCV y son importantes para el remodelamiento de sus membranas. La SCV temprana tiene características similares a endosomas tempranos: PI(3)P y proteínas como Rab5 y SNX1. Durante la fase temprana de infección, disminuye la expresión de efectores T3SS-1 y aumenta la expresión de efectores T3SS-2. La mayoría de SCVs se localizan en una posición yuxtannuclear en 1-2 horas y son ricas en proteínas Lamp1, Rab7 y ATPasa vacuolar, normalmente presentes en endosomas y lisosomas tardíos. Sin embargo, algunas SCV no pasan por este proceso de maduración y en su lugar se lisan, y liberan las bacterias o pasan por un proceso de autofagia. La maduración de SCVs se lleva a cabo dentro de 4-6 horas post invasión y se acompaña de una red tubular. Los túbulos ricos en Lamp1 son conocidos como Sifs y recientemente se han descubierto túbulos carentes de esta, denominados SISTs. *Salmonella* también puede invadir células mediante una vía independiente de T3SS1.

2.5 Respuesta inmune

Todos los individuos sanos están preparados para reconocer a nivel inmunológico tanto a los agentes externos que penetran en sus tejidos como a componentes propios que dejan de ser funcionales o se encuentran alterados. Para ello los organismos multicelulares han desarrollado un sistema de reconocimiento, que ha evolucionado hasta formar una compleja red de moléculas y células, al que se llama sistema inmune. Éste puede estudiarse en dos grandes rubros: el sistema inmune innato y el sistema inmune adquirido. Una vez que se ha generado la inmunidad adquirida, el organismo queda capacitado para reconocer y, en su caso, neutralizar, destruir y eliminar los agentes extraños o células indeseables. Para ello el sistema inmune utiliza los anticuerpos, es decir las moléculas efectoras de la llamada respuesta inmune humoral o los linfocitos T que son las células mediadoras de la respuesta inmune celular (Gutiérrez, 2010).

Las respuestas inmunes humoral y celular participan de manera distinta para proteger a un individuo: en la primera, los anticuerpos, que son moléculas altamente específicas, pueden unirse a los antígenos (agente extraño) en la superficie de las células o en el espacio extracelular y neutralizarlos o eliminarlos con ayuda de componentes de la respuesta innata, como el complemento, las células fagocíticas o las células NK (natural killers). Por el contrario, en la respuesta celular los linfocitos detectan células tumorales o que han sido infectadas con microorganismos intracelulares y las destruyen, ya sea por una acción directa o mediante la liberación de citocinas y la activación de células del sistema innato, como los macrófagos o las células NK. Aunque las respuestas humoral y celular tienen muchos elementos distintos, no son por completo independientes: algunos péptidos quimiotácticos que se generan por la activación del complemento, en respuesta a una reacción antígeno-anticuerpo, pueden ayudar a reclutar células que participan en la respuesta celular. Además muchas células, como las NK, los macrófagos, los neutrófilos y los eosinófilos pueden usar los anticuerpos para reconocer y destruir sus células blanco (Gutiérrez, 2010).

La inmunidad celular es mediada de modo principal por los linfocitos T timo-dependientes o de las células efectoras activadas por las proteínas producidas por ellos (macrófagos). Este tipo de inmunidad es montada para la defensa del organismo en contra de ataques de bacterias intracelulares principalmente y para frenar la reproducción de células cancerígenas. La inmunidad celular comienza por el reconocimiento de los antígenos, ya sean los previamente fagocitados y presentados por las células presentadoras de antígenos (APC) a los linfocitos Th1 a través del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) tipo II, o bien, a través de la presentación de antígenos virales o bacterianos a través del MHC tipo I por la mayoría de células del cuerpo. Los linfocitos T en general reconocen antígenos proteicos aunque hay algunas estirpes de estos que son capaces de reconocer antígenos lipídicos (Gutiérrez, 2010).

2.5.1 Linfocitos T

Se define al linfocito T como una célula de maduración tímica, que posee en la superficie de la membrana un receptor de reconocimiento de las células T (TRC). Este receptor está formado por dos cadenas polipeptídicas diferentes a nivel estructural, que conforman dos tipos de heterodímeros los cuales son $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$, que forman a su vez complejos con la molécula CD3. Tanto en animales domésticos como en humanos, la mayoría de linfocitos periféricos (95-98%) expresan TCR- $\alpha\beta$ y una pequeña porción (2-5%) expresan TCR- $\gamma\delta$, con excepción de los rumiantes en donde, en individuos jóvenes el 60% corresponde a linfocitos $\gamma\delta$. Esta última población es más común en los linfocitos intraepiteliales, por lo que se piensa que juegan un papel importante en la defensa de las mucosas. Los linfocitos T representan alrededor del 70% del total de linfocitos periféricos. Son células de larga vida se pueden encontrar circulando en la sangre o colonizando órganos linfoides periféricos. Los linfocitos pueden encontrarse en estado de reposo o bien activados bajo dos formas fenotípicas, básicamente TCD4+ y TCD8+ (Gutiérrez, 2010). Los linfocitos T se pueden dividir en varias poblaciones de acuerdo a sus marcadores de superficie, citocinas secretadas y funciones específicas. Dependiendo del fenotipo los linfocitos T ejercerán funciones efectoras, de

cooperación o de regulación (CD4+) o bien citotóxicas (CD8+) (Gutiérrez, 2010).

Linfocitos CD8+ citotóxicos

Son células efectoras cuya principal es eliminar microorganismos intracelulares a través de la destrucción de la célula hospedera. El proceso mediante el cual empieza la inmunidad citotóxica (CTL) es variable, pero se puede decir que todo comienza cuando los antígenos de microorganismos intracelulares o de cualquier virus es degradado dentro de las células tanto APC como células epiteliales a través de la proteólisis intracelular llevada a cabo por el proteosoma; las fracciones antigénicas de origen proteicas son unidas en el retículo endoplásmico al MHC I y presentadas en la superficie de las células. Los linfocitos T citotóxicos utilizan dos mecanismos para destruir dianas: la ruta intrínseca utilizando perforinas y granzimas, o la ruta extrínseca utilizando el receptor de la muerte Fas (CD95) y su ligando (Tizard, 2009).

Linfocitos CD4+

La actividad de las subpoblaciones CD4+ se ejercen a través de interacciones directas o mediante la acción de interleucinas, las cuales son fundamentales para el inicio o regulación de la respuesta inmune. Los linfocitos T CD4+ se pueden dividir en cuatro tipos diferentes de subpoblaciones: Th1, Th2, Th17 y Treg. Las subpoblaciones mejor definidas en la actualidad son Th1 y Th2; en general la diferencia entre las Th1 y Th2 es que las primeras producen altas cantidades de IFN- γ el cual activa la respuesta celular, mientras que las segundas IL-4 e IL-5, son responsables de la inmunidad humoral (Gutiérrez, 2010).

- ✓ **Subpoblación Th1:** Producen altas cantidades de IFN- γ el cual activa la respuesta celular y favorece la diferenciación de los linfocitos vírgenes o Th0 a Th1, además que inhibe la proliferación de linfocitos tipo Th2. La producción de IL-4 sintetizada por los linfocitos Th2 favorece la

diferenciación hacia Th2 y la IL-10 secretada por esta subpoblación así como las Treg, inhibe el desarrollo de Th1.

- ✓ **Subpoblación Th2:** La respuesta inmune se inicia cuando la célula presentadora de antígeno presenta el antígeno a un linfocito T Th2 a través del TCR y talvés en presencia de algunos moduladores paracrinos. La principal función es favorecer la inmunidad mediada por anticuerpos, eosinófilos y células cebadas. Los linfocitos Th2 secretan IL-4, IL-5 e IL-13. La IL-4 e IL13 estimulan la producción de anticuerpos y se han relacionado mucho en la inmunidad a parásitos.
- ✓ **Subpoblación Th17:** Dado el nombre debido a la producción de moléculas proinflamatorias basadas en la familia de la citocina Th17. En esta familia están incluidos IL-17 (IL17A). IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25) e IL-17F. IL-17A promueve con fuerza la inflamación induciendo citocinas proinflamatorias y quimiocinas que atraen a granulocitos y macrófagos activados. Las células dendríticas son capaces de producir IL-23 tanto como IL-12; de hecho antes se pensaba que IL-23 era una alternativa para producir IL-12. Más tarde se demostró que IL-23 estaba relacionado con otra subpoblación de células tipo CD4+, la cual ahora se conoce como Th17 y que IL23 es la responsable de la sobrevivencia y mantenimiento de esta subpoblación. Las células Th17 se diferencian bajo la influencia de IL-6 y TGF- β durante la presentación antigénica. Se ha propuesto que la función principal de los linfocitos Th17 están dirigidos contra diferentes clases de patógenos llamados extracelulares (Gutiérrez, 2010).
- ✓ **Subpoblación T reguladores:** La función principal es reprimir la activación de la respuesta inmune mediada por células y así mantener la homeostasis del sistema inmune y la tolerancia hacia los antígenos propios. Se diferencian de las Th2 debido a la expresión de un factor de transcripción característico conocido como FOXP3. La expresión de FOXP3 es requerida para el desarrollo de las Treg y parece que controla los programas genéticos para la maduración de éstas células. La gran

mayoría de células Treg que expresan FOXP3 tienen el marcador CD4+, reconocen a través del MHC-II y expresan altos niveles de la cadena α del receptor de interleucina-2 (CD25). Además de expresar CD4+CD25+ parece que hay una pequeña población de Treg que pueden reconocer antígenos a través de MHC-I; estas células son identificadas como CD8+FOXP3+. El mecanismo mediante el cual las Treg ejercen su actividad se ha demostrado in vitro, esta subpoblación de linfocitos secreta citocinas inmunosupresoras como el TGF- β y la IL-10 y durante el proceso infeccioso las Treg son reguladas directamente o indirectamente por otro tipo de subpoblación como la Th1 o las Th17 (Gutierrez, 2010).

2.5.2 Linfocitos B

Los antígenos que activan las células T y las células B establecen respuestas de inmunoglobulinas (Ig) en las que las células T proporcionan "ayuda" para que las células B maduren. Esta maduración incluye tanto la inducción de la conmutación de isotipo, en la que las células T controlan el isotipo de Ig producido y la activación de la mutación somática. Las interacciones celulares que subyacen a la ayuda de las células T son impulsadas por el antígeno específico y aprovechan la capacidad de las células B para servir como célula presentadora de antígeno. Las células B que capturan su antígeno relacionado a través de su Ig de membrana pueden internalizar el antígeno y procesarlo intracelularmente para su presentación en la superficie celular en las proteínas MHC clase II de las células B. La absorción del antígeno induce una mayor expresión de clase II y expresión de CD80 y CD86. Las células T activadas por esta combinación de co-estimulador y complejo de clase II de antígeno en la célula B se señalizan recíprocamente a la célula B mediante la interacción del ligando CD40 de la célula T (CD40L) con la célula B CD40. La señalización a través de CD40 es esencial para la inducción del cambio de isotipo (Durandy *et al.*, 2007).

El cambio de isotipo y las mutaciones somáticas están fuertemente asociados con el desarrollo de la memoria de células B. Las respuestas de memoria, definidas como inducción rápida de altos niveles de anticuerpos de alta

afinidad después del desafío secundario con antígenos, se caracterizan por la producción de anticuerpos IgG, IgA e IgE y por mutaciones somáticas en los dominios de unión a antígeno de las cadenas pesada y ligera de estos anticuerpos. El desarrollo de la memoria de las células B es fundamental para el éxito de la vacunación contra los patógenos. Los mecanismos que involucran a los linfocitos T y B trabajan en conjunto, y la respuesta inmune completamente integrada extrae elementos de muchos sistemas efectores para adaptar una respuesta al patógeno invasor específico (Tangye *et al.*, 2009).

2.5.3 Citoquinas

Las citoquinas (citocinas) se unen a receptores específicos localizados en la superficie de la célula blanco los cuales estimulan diferentes vías de señalización celular que al final inducen cambios en la expresión genética. La susceptibilidad de las células a las citocinas está relacionada con la expresión de receptores específicos. Estos receptores en la mayoría de los casos se expresan, constitutivamente, como monómeros a un bajo nivel y con poca afinidad, sin embargo ante un estímulo inductor aumentan su número y forman heterodímeros o heterotrímeros de alta afinidad por la citocina en particular; por los que los receptores, se expresan de manera diferencial y temporal en los diferentes leucocitos. La afinidad entre las citocinas y sus receptores es muy alta con una constante de disociación de 10^{-12} , lo cual implica que a una concentración relativamente baja pueden ejercer su efecto biológico (Gutiérrez, 2010). Las citocinas tienen un papel fundamental en la comunicación entre diferentes tipos celulares y son secretadas por diferentes células, su nombre refleja estas características. Algunas citocinas son llamadas interleucinas seguidas de un número progresivo, el término indica que son secretadas por leucocitos y permiten la comunicación entre éstos así como con otras células, en la actualidad se conocen de la IL-1 a la IL-35. Otras citocinas tienen nombre que reflejan la función observada cuando se descubrieron, por ejemplo el factor de necrosis tumoral (TNF- α) refleja su capacidad de necrosar células tumorales y los IFN- α , IFN- β o IFN- γ cuyos

nombres denotan su capacidad para intervenir con la infección viral de la célula. Algunas citocinas son agrupadas bajo el término de quimiocina, que significa citocina quimiotáctica, este grupo incluye a la IL-8 y cerca de 50 quimiocinas que han recibido diferentes nombres triviales o acrónimos como proteína quimiotáctica para monocitos-1 (MCP-1), proteína inflamatoria para macrófagos 1α (MIP1- α), regulado, expresado y secretado a la activación de células T normales (RANTES), entre otros. Sin embargo, hoy en día todas las quimiocinas siguen una nomenclatura específica que consiste en la siglas CCL, CXCL, XCL y CX3CL, seguidas de un número progresivo; sus receptores utilizan su misma nomenclatura sustituyendo la L de ligando por la R. En la actualidad, el término citocina incluye a todas las interleucinas, las quimiocinas, los interferones, los factores de necrosis tumoral y algunas otras como los factores estimuladores de colonias (GM-CSF y G-CSF) (Gutierrez, 2010).

2.5.3.1 Estructura

Las citocinas generalmente tienen un peso molecular menor de 30kDa. De acuerdo a su estructura las citocinas se clasifican en cuatro familias: las hematopoyetinas, los interferones, los factores de necrosis tumoral y las quimiocinas. La familia de las hematopoyetinas se caracteriza por tener cuatro hélices alfa de cadenas cortas o largas, y comprenden la mayoría de las citocinas, entre otras: GM-CSF, G-CSF, IL-2 al 7, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15. La familia de los interferones se caracteriza por tener principalmente plataformas β ; mientras que la familia de las quimiocinas tiene plataformas beta y pocas hélices α , además tiene cuatro cisteínas conservadas características (Gutierrez, 2010).

2.5.3.2 Funciones

Las citocinas funcionan como moléculas mensajeras intercelulares que inducen una actividad biológica en particular después de unirse a su receptor en una célula blanco competente, es decir, que expresa receptores específicos. Una gran variedad de células pueden secretar citocinas

destacando a los linfocitos T CD4+ cooperadores activados, seguidos de las células presentadoras de antígenos profesionales activadas (macrófagos, linfocitos B y células dendríticas); así como células de la inmunidad innata incluyendo células NK y células cooperadoras naturales. Las citocinas liberadas por estas células activan toda una red de células capaces de interactuar con otras células. Cuando la molécula de señalización se unen a estos receptores alteran el comportamiento celular a través de un proceso denominado “transducción de señales”, generándose factores de transcripción. Las células alteran su comportamiento y secretan nuevas citoquinas como resultado de la transcripción génica (Tizard, 2009).

Las respuestas funcionales de las citocinas incluyen en el desarrollo de la inflamación, la inducción de la respuesta inmune humoral y celular, la hematopoyesis, así como la proliferación y diferenciación celular, la cicatrización de heridas, la implantación del óvulo fecundado en el útero, la reabsorción embrionaria, entre otros. Aunque la respuesta específica a un antígeno incluye la producción de citocinas, éstas actúan de manera no específica, ya que afectan a cualquier célula siempre y cuando no exprese los receptores apropiados y se encuentre en un estado fisiológico que le permita responder. Sin embargo, la inducción de la expresión de citocinas de manera local, la concentración requerida y su vida media, hacen que estas actúen en las células blancas adecuadas en la mayoría de los casos. Las funciones atribuidas a cada citocina en particular han sido determinadas mediante el análisis de citocinas clonadas, agregadas a concentraciones no fisiológicas, y de manera individual en sistemas in vitro con líneas celulares con o sin sobre-expresión del receptor; también se han utilizado siRNA para bloquear (*knockdown*) la expresión de citocinas o su receptor in vitro. In vivo se han utilizado ratones con eliminación (*knockout*), o sobre-expresión (transgénico) de algún gen de citocina o a su receptor. Sin embargo, es importante considerar que las citocinas no actúan solas in vivo, es decir la célula blanca es expuesta a una mezcla de citocinas cuya combinación de sus efectos sinérgicos y antagónicos pueden tener consecuencias muy diferentes. Además, las citocinas frecuentemente inducen la síntesis de otras citocinas que resultan en una cascada de efectos en las que las citocinas producidas

en estadios posteriores en la cascada, pueden influenciar las respuestas a las citocinas producidas en los estadios tempranos. Las citocinas se deben unir a su receptor específico expresado en la membrana de la célula susceptible, para poder ejercer su efecto biológico. Debido a que estos receptores son expresado en diferentes células, las citocinas pueden afectar a una gran variedad de células (Gutierrez, 2010).

2.5.3.3 Perfiles de citoquinas en linfocitos

La efectividad de la respuesta inmune contra un agente infeccioso, dependerá de la inducción de moléculas y células efectoras capaces de neutralizar los factores de virulencia, contener su colonización y finalmente eliminar el patógeno. Una toxina bacteriana soluble puede ser neutralizada por anticuerpos derivados de las células plasmáticas; del mismo modo, las moléculas involucradas en la adherencia del patógeno a la célula, pueden ser neutralizadas por anticuerpos para impedir la colonización y la invasión del patógeno al huésped; mientras que respuestas a bacterias intracelulares y virus, requiere de citotoxicidad mediada por células T citotóxicas CD8+ o bien de la hipersensibilidad tardía o tipo IV caracterizada por células T cooperadoras CD4+, macrófagos activados o fibroblastos. Existe evidencia de diferencias en los perfiles de secreción de citocinas entre diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD4+ cooperadores que determinan el tipo de respuesta inmune que se desarrollará contra el desafío con el patógeno. Los linfocitos T CD4+ cooperadores activados, ejercen la mayoría de sus funciones a través de las citocinas que secretan. Existen cuatro subpoblaciones de linfocitos T CD4+ que pueden distinguirse in vitro por el perfil de citocinas que producen. Los linfocitos T CD4+, después de encontrarse con antígenos extraños presentados por la célula presentadora de antígenos profesional, en contexto con el MHC clase II, pueden diferenciarse en linfocitos T CD4+ Th1, Th2, Th17 cooperadores y T reguladores. Esta diferenciación es inducida por las citocinas producidas por células de la inmunidad innata como las células presentadoras (macrófagos, dendríticas y células B), las células NK y las células cooperadoras naturales. La diferenciación a Th1 es inducida por la IL-12 e IFN- γ , mientras que la IL-4

induce diferenciación a Th2. TGF- β en conjunto con IL-6 induce diferenciación a Th17, mientras que la Treg es inducida por TGF- β , ácido retinoico e IL-2. Se han identificado factores de transcripción específicos para la diferenciación de cada subtipo de linfocito T CD4+, T-bet para Th1, GATA3 para Th2, ROR γ t para Th17 y Foxp3 para Treg. Las subpoblaciones denominadas Th1 y Th2, ambas secretan IL-3 y GM-CSF, pero difieren en el resto de las citocinas que secretan. El perfil de linfocitos CD4+ Th1 incluye: IL-2, IFN- γ , TNF- β , IL-3 y GM-CSF. El perfil de linfocitos CD4+ Th2 incluye: IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-3 y GM-CSF (Abbas, 2012).

Citoquinas producidas por linfocitos Th1

- ✓ **IFN- γ :** es la principal citocina activadora del macrófago y sirve en funciones fundamentales de la inmunidad contra los microbios intracelulares. Es una proteína homodimérica, también lo producen los linfocitos NK y los linfocitos CD8+. Los linfocitos NK secretan IFN- γ en respuesta a ligandos activadores situados en la superficie de células infectadas o estresadas del anfitrión o en respuesta a la IL-12; en este marco, el IFN- γ funciona como un mediador de la inmunidad innata. En la inmunidad adaptativa, los linfocitos T producen IFN- γ en respuesta al reconocimiento del antígeno, y su producción aumenta por medio de la IL-12 y la IL-18.
- Activa los macrófagos para que maten microbios fagocitados, la característica principal de los macrófagos “activados de forma clásica”.
- El IFN- γ actúa sobre los linfocitos B para promover el cambio a ciertas subclases de IgG, sobre todo IgG2a o IgG2c (en ratones), e inhibir el cambio a los isotipos dependientes de la IL-4, como la IgE.
- Promueve la diferenciación de los linfocitos T CD4+ en el subgrupo Th1 e inhibe la diferenciación de los linfocitos Th2 y Th17.
- Estimula la expresión de varias proteínas diferentes que contribuyen a aumentar la presentación del antígeno asociada al MHC y al inicio y amplificación de las respuestas inmunitarias dependientes del linfocito T.

- ✓ **IL-2:** Es necesaria para la supervivencia y función de los linfocitos T reguladores, células encargadas de suprimir las respuestas inmunitarias contra antígenos propios y otros antígenos. De hecho, los ratones con genes inactivados que carecen de IL-2 o de su receptor para la IL-2 presentan una proliferación descontrolada de los linfocitos T y B, y una enfermedad autoinmune debida a un defecto en los linfocitos T reguladores. Estos estudios indican que otros factores de crecimiento pueden reemplazar a la IL-2 en la expansión de los linfocitos T efectores, pero que ninguna otra citoquina puede sustituir a la IL-2 en el mantenimiento de los linfocitos T reguladores funcionales. Una característica interesante de esta función de la IL-2 es que los linfocitos T reguladores no producen cantidades significativas de la citoquina, lo que implica que dependen para su supervivencia de la IL-2 producida por otros linfocitos T que responden a antígenos extraños (Abbas *et al.*, 2012).

- ✓ **IL-12:** Sus principales fuentes son las células dendríticas y los macrófagos activados. Durante las reacciones de la inmunidad innata frente a los microbios, la IL-12 se produce en respuesta al TLR y otros receptores del reconocimiento del patrón que producen señales inducidas por muchos estímulos microbianos, como el LPS y las infecciones víricas. El IFN- γ producido por los linfocitos NK o los linfocitos T también estimula la producción de IL-12 lo que contribuye a un asa de retroalimentación positiva. Potencia la citotoxicidad mediada por los linfocitos NK y los CTL. La IL-12 secretada por la célula dendrítica durante la presentación del antígeno a los linfocitos T vírgenes CD4⁺ promueve su diferenciación en el subgrupo Th1 de linfocitos T cooperadores, lo que es importante contra las infecciones intracelulares (Abbas *et al.*, 2012).

- ✓ **TNF- α :** Coestimulador en la producción de IFN- γ . Es producido principalmente por macrófagos, también por otros tipos celulares como los linfocitos CD4⁺, NK, neutrófilos, mastocitos y neuronas; por lo que se considera una citoquina de la inmunidad innata como adquirida (Hamerman *et al.*, 2005; Vivier *et al.*, 2011; Gabrielli *et al.*, 2016). El TNF- α , junto a IL1 e IL6, participan como mediadores principales de la inmunidad natural

contra bacterias gram-negativas y son mediadores clave de las respuestas inflamatorias y el shock séptico. Es un mediador de la respuesta inflamatoria aguda (Abbas et al., 2012).

- ✓ El factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (**GM-CSF**), interleucina-3 (**IL-3**) e IL-5 son miembros de una familia discreta de citocinas que regula el crecimiento, la diferenciación, la migración y las actividades efectoras de muchas células hematopoyéticas e inmunocitos. Estas citoquinas están involucradas en respuestas normales a agentes infecciosos, puenteando la inmunidad innata y adaptativa. Sin embargo, en ciertos casos, la sobreexpresión de estas citoquinas o sus receptores puede conducir a una iniciación excesiva o aberrante de señalización que da como resultado condiciones patológicas, con enfermedades inflamatorias crónicas y leucemias mieloides como los ejemplos más notables. Las estructuras cristalinas recientes del complejo ternario del receptor GM-CSF y el complejo binario IL-5 han revelado nuevos paradigmas de activación del receptor de citoquina. Junto con una gran cantidad de estudios de estructura-función asociados, han mejorado significativamente nuestra comprensión de cómo estos receptores reconocen las citocinas e inician señales a través de las membranas celulares. Es importante destacar que estas estructuras proporcionan oportunidades para enfoques basados en la estructura para el descubrimiento de terapias novedosas y específicas de la enfermedad. Además, la evidencia bioquímica reciente ha sugerido que la familia de receptores GM-CSF/IL-3/IL-5 es capaz de interactuar productivamente con otras proteínas de membrana en la superficie celular. Tales interacciones pueden proporcionar actividades biológicas adicionales o únicas y podrían aprovecharse para la modulación selectiva de la función de estos receptores en la enfermedad (Broughton et al., 2012).

Además del IFN- γ , los linfocitos Th1 producen TNF- α y varias quimiocinas, que contribuyen al reclutamiento de los leucocitos y a aumentar la inflamación. Los linfocitos Th1 también son fuente importante de IL-10, que inhibe sobre

todo, las células dendríticas y los macrófagos, y suprime así la activación de Th1, lo que resulta sorprendente. Este es un ejemplo de un asa de retroalimentación negativa en las respuestas de los linfocitos T (Abbas, 2012).

En las respuestas inmunitarias celulares contra los microbios fagocitados, los linfocitos T reconocen específicamente antígenos microbianos, pero son los fagocitos los que destruyen realmente a los microorganismos patógenos. Los linfocitos CD4⁺ Th1 activan a los macrófagos mediante señales mediadas por el contacto de las interacciones CD40L- CD40 y IFN- γ . Los macrófagos activados matan a los microbios fagocitados, sobre todo por las acciones de las especies reactivas del oxígeno, el óxido nítrico y las enzimas lisosómicas (Abbas et al., 2012).

Citoquinas producidas por linfocitos Th2

Los linfocitos Th2 estimulan reacciones mediadas por la IgE y el eosinófilo que sirven para erradicar infecciones helmínticas. Las funciones de los linfocitos Th2 están mediadas por la IL-4, que induce respuestas de anticuerpos IgE; la IL-5, que activa a los eosinófilos; y la IL-13, que ejerce diversas acciones.

- ✓ **INTERLEUCINA 4:** Es el principal estímulo para la producción de anticuerpos IgE y para el desarrollo de los linfocitos Th2 a partir de los linfocitos T cooperadores CD4⁺ vírgenes. La IL-4 funciona como citocina inductora y efectora de otras células. La IL-4 es un miembro de la familia de citocinas de cuatro hélices α . Las principales fuentes celulares de IL-4 de las células linfocíticas consiste en una cadena α , que se une a la citocina que es miembro de la familia de receptores para citocinas de tipo I, asocia a la cadena γ_c , compartida con otros receptores para citocinas. Este receptor IL-4R γ_c transmite señales a través de la vía JAK-STAT (JAK3 o JAK4 y STAT6) y de una vía en la que interviene el sustrato de respuesta a la insulina (IRS, del inglés insulin response substrate) llamado IRS-2. La IL-4 y la IL-13 activan la proteína STAT6, que induce la transcripción de genes que son responsables de muchas de las acciones de estas

citocinas. La IL-4 también se une al receptor para la IL-13 (Abbas et al., 2012).

- La IL-4 estimula el cambio de clase de cadena pesada de Ig en el linfocito B hacia el isotipo IgE.
- La IL-4 estimula el desarrollo de los linfocitos Th2 y funciona como un factor de crecimiento autocrino para los linfocitos Th2 diferenciados.
- La IL-4 junto con la IL-13, contribuyen a una forma alternativa de acción del macrófago que es diferente de la respuesta del macrófago al IFN- γ . Suprimen la activación clásica del macrófago mediada por IFN- γ , y así inhiben la defensa contra los microbios intracelulares.
- La IL-4 (y la IL-13) estimulan el peristaltismo en el tubo digestivo, y la IL-13 aumenta la secreción de moco en las células epiteliales de la vía respiratoria del intestino. IL-4 y la IL-13 estimulan el reclutamiento de leucocitos.

✓ **INTERLEUCINA 10:** También conocida como factor de inhibición de la síntesis de citoquinas (CSIF sus siglas en inglés), es una citoquina con propiedades antiinflamatorias capaz de inhibir la síntesis de citoquinas proinflamatorias producidas por linfocitos T y macrófagos. Es producida por monocitos/macrófagos, linfocitos Th2 y linfocitos B, inhibe la producción de las citoquinas IL-2, IFN- γ , IL-6, IL-8 e IL-12 de los monocitos/macrófagos y neutrófilos y la respuesta de los linfocitos Th1. Circula en forma de homodímero que consiste de dos proteínas de 160 aminoácidos. Inhibe la expresión de moléculas MHC-II, moléculas accesorias tipo B7 y la proteína CD14 en la superficie celular. También inhibe la síntesis de citoquinas en neutrófilos y células NK, inhibe la translocación nuclear del NF- κ B y promueve la degradación del ARN mensajero (ARNm) de las citoquinas proinflamatorias. Por otro lado, atenúa la expresión del receptor de TNF y promueve su desprendimiento hacia la circulación. Puede medirse durante las infecciones sistémicas y en estados inflamatorios, por lo que su administración durante endotoxemias ha resultado en mejoramiento de la supervivencia en

modelos animales gracias a menor efecto sistémico de las citoquinas (Opal y De Palo, 2000).

Tiene efecto inhibitorio autocrino sobre macrófagos y células dendríticas, limita las funciones innatas de estas células, impidiendo la activación subsecuente de células T. Por otro lado, aumenta la expresión de sí misma en células T reguladoras, promoviendo su propia síntesis en un sistema de retroalimentación positivo que limita la respuesta inmune. Dentro de los mecanismos de regulación destaca la participación de moléculas agonistas de TLR2 en células presentadoras de antígeno donde se encuentran PAMP's (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos), estas moléculas son cruciales para la síntesis de IL-2 en macrófagos y células dendríticas, aunque las células plasmacitoides no producen IL-10. Luego de que una molécula se ha ligado al TLR, es necesaria la participación de moléculas adaptadoras como MYD88 (MAPK y NFκB) y TRIF. Es de notar que la inducción óptima de IL-10 desde antígenos tipo LPS requieren la participación de ambas vías de señalización además de requerir moléculas accesorias como IFN-γ. Parte de su regulación depende también de la expresión de IL-6 que induce la expresión de IL-21 y que finalmente de manera autocrina promueve la expresión de IL-10 según lo encontrado en células dendríticas de médula ósea estimuladas con LPS in vitro (Maynard *et al.*, 2009).

- ✓ **INTERLEUCINA 13:** La IL-13 tiene una estructura y función similares a la IL-4, y también desempeña una función clave en la defensa contra los helmintos y en las enfermedades alérgicas. La IL-13 es un miembro de la familia de citocinas con cuatro hélices α, con una homología de secuencia limitada, pero una similitud estructural significativa a la IL-4. IL-13 la produce, sobre todo, el subgrupo Th2, pero también pueden producirla los basófilos, los eosinófilos y los linfocitos NKT. El receptor funcional para la IL-13 es un heterodímero de la cadena IL-4Rα y de la cadena IL-13Rα1. Este complejo puede unirse a la IL-4 y a la IL-13 con alta afinidad, y es responsable del hecho de que la IL-4 comparta la mayoría de los efectos biológicos de la IL-13. El receptor se expresa en una amplia variedad de

células, como los linfocitos B, los fagocitos mononucleares, las células dendríticas, los eosinófilos, los basófilos, los fibroblastos, las células endoteliales y las células epiteliales bronquiales. Los linfocitos T no expresan el receptor para la IL-13. Las señales producidas por el IL-13R son similares a las producidas por el IL-4R.

La IL-13 actúa junto con IL-4 en la producción de efectos biológicos asociados a la inflamación alérgica y en la defensa contra los helmintos. Algunas de las acciones de la IL-13 se solapan con las de la IL-4 y otras son diferentes. La IL-13 funciona con la IL-4 en la inducción de una activación alternativa del macrófago, lo que contribuye a la reparación del tejido y la fibrosis. La IL-13 estimula la producción de moco por las células epiteliales de la vía respiratoria, un componente importante de reacciones alérgicas como el asma. La IL-13 y la IL-4 pueden activar los linfocitos B para que cambien al isotipo IgE y a algunos IgG, y reclutar leucocitos. Al contrario que la IL-4, la IL-13 no participa en la diferenciación Th2 (Abbas, 2012).

La IL-4 y la IL-13 activan los macrófagos para que expresen enzimas que promueven la síntesis de colágeno y fibrosis. La respuesta del macrófago a las citocinas Th2 se ha llamado activación alternativa del macrófago, para distinguirla de la activación inducida por el IFN- γ . Los macrófagos activados de la forma alternativa inducen la formación del tejido fibroso al secretar factores de crecimiento que estimulan la proliferación del fibroblasto, síntesis de colágeno (TGF- β) y la formación de vasos sanguíneos nuevos. Las citocinas Th2 suprimen la activación clásica del macrófago e interfieren con las respuestas inmunitarias protectoras mediadas por Th1 frente a infecciones intracelulares. La supresión de la activación clásica del macrófago se debe en parte a que la IL-4 estimula la producción de citocinas como la IL-10 y el **TGF- β** que inhiben el desarrollo y la función Th1 (Abbas, 2012).

- ✓ **INTERLEUCINA 5:** Es un activador de los eosinófilos y sirve de nexo principal entre la activación del linfocito T y la inflamación. Las principales acciones de la IL-5 son activar los eosinófilos maduros y estimular el crecimiento y diferenciación de los eosinófilos.
- ✓ **TGF- β :** Tiene múltiples funciones en procesos inmunes. Suprime el crecimiento y diferenciación de muchos linajes de células inmunes, incluyendo células T y B. Regula la expresión de moléculas de adhesión, especialmente en la médula ósea y en el microambiente tímico. Es un quimio atrayente para fibroblastos, monocitos y neutrófilos e inhibe la activación del sistema inmune por presentación antigénica o de interleucinas. In vivo inhibe la secreción de IgG e IgM y suprime la hematopoyesis dependiente de IL-3. De manera importante y relevante, TGF- β también regula la proliferación y maduración en células B y tiene un papel regulatorio crítico en la expresión de IgA (Gálvez et al., 2004).

Citoquinas producidas por linfocitos Th17

Los linfocitos Th17 secretan citocinas que reclutan leucocitos, sobre todo neutrófilos, en los lugares de infección. Como los neutrófilos son un mecanismo de defensa importante contra las bacterias extracelulares y los hongos, los linfocitos Th17 pueden desempeñar una función especialmente importante en la defensa contra estas infecciones.

- ✓ **INTERLEUCINA 17:** Es una citocina inusual, porque ni ella ni su receptor son homólogos a ninguna otra pareja citocina-receptor conocida. La familia de la IL-17 comprende seis proteínas con una estructura similar, de las que la IL-17A y la IL-17F son las más similares, y las actividades inmunitarias parecen mediadas, sobre todo, por la IL-17A. La IL-17A y la IL-17F las producen, sobre todo, los linfocitos Th17, mientras que otros miembros de la familia los producen diversos tipos celulares. Los receptores para la IL-17 son multiméricos y se expresan en una amplia variedad de células. Su estructura y mecanismos transmisores de señales no se han definido bien. La IL-17 es un nexo importante entre la inmunidad adaptativa mediada por

el linfocito T y el sistema inmunitario innato, especialmente el componente inflamatorio de las respuestas innatas. La IL-17 induce reacciones inflamatorias ricas en neutrófilos y estimula la producción de sustancias antimicrobianas, como las defensinas, en numerosos tipos celulares (Abbas, 2012).

✓ Otras citoquinas

IL-22 es un miembro de la familia de citocinas de la IL-10. La producen los linfocitos T activados, particularmente los linfocitos th17, y los linfocitos NK. Las acciones de la IL-22 parecen contradictorias. Algunos estudios indican que contribuye a la inflamación y lesión tisular, pero el grueso de los datos disponibles indica que se produce en los tejidos especialmente en la piel y el tubo digestivo, y sirve para mantener la integridad epitelial, sobre todo al promover la función de barrera del epitelio y estimular las reacciones reparativas (Abbas, 2012).

IL-21 la producen los linfocitos T activados CD4+, incluido los linfocitos Th17, y tienen varios efectos sobre los linfocitos B y T, y los linfocitos NK. El receptor para la IL-21 pertenece a la familia de receptores para citocinas del tipo I, consta de una cadena que se une al ligando y de la subunidad γ_c , y activa a la vía de transmisión de señales JAK-STAT, en la que destaca especialmente STAT3. Una función importante de la IL-21 se da en la respuesta de anticuerpos, especialmente en las reacciones que ocurren en los centros germinales. La IL-21 es necesaria para la generación de linfocitos T cooperadores foliculares, y también la producen los linfocitos cooperadores foliculares y estimula a los linfocitos B en los centros germinales. También se ha demostrado que la IL-21 promueve la diferenciación de los linfocitos Th17, especialmente en los seres humanos. Lo que constituye una vía autocrina de amplificación de las respuestas Th17. Algunas de las otras acciones publicadas de la IL-21 son el aumento de la proliferación y de la función efectora de los linfocitos T CD8+ y de los linfocitos NK (Abbas, 2012).

2.6 Respuesta inmune innata a la infección por *Salmonella*

Salmonella inicialmente interactúa con las células epiteliales, que pueden reconocer bacterias patógenas, iniciar una respuesta inflamatoria y reclutar una variedad de fagocitos derivados de la médula ósea (Kaiser y Hardt, 2011). La respuesta inmune temprana a *Salmonella* en las Placas de Peyer (PP) y nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) implica el reclutamiento de neutrófilos y monocitos inflamatorios, y estas respuestas son importantes para retrasar la propagación sistémica de la bacteria (Rydstrom y Wick, 2007). Diversos estudios han demostrado que una disminución de neutrófilos aumenta la carga bacteriana extracelular de *Salmonella* dentro de la microvasculatura hepática, lo que sugiere que los neutrófilos contribuyen eficazmente a la defensa temprana y previenen la diseminación sistémica (Conlan, 1996). Se ha demostrado que los neutrófilos bajo la influencia de *Salmonella* son una fuente celular importante de IFN- γ en la mucosa intestinal durante la fase de infección por el serotipo Typhimurium. La depleción de neutrófilos por el anticuerpo anti-Ly6G impidió la expresión temprana de IFN- γ y redujo la gravedad de las lesiones histopatológicas durante la infección con serovar Typhimurium (Spees *et al.*, 2014). Las células NK cumplen un papel importante en la producción de IFN- γ durante la etapa temprana de la infección en modelos murinos. Un estudio reciente confirmó el papel de las células Thy1+ NK, en la producción de IFN- γ durante la infección inicial por Typhimurium, sugiriendo un papel importante para este tipo de células en la mediación del control dependiente de IFN- γ (Kupz *et al.*, 2013).

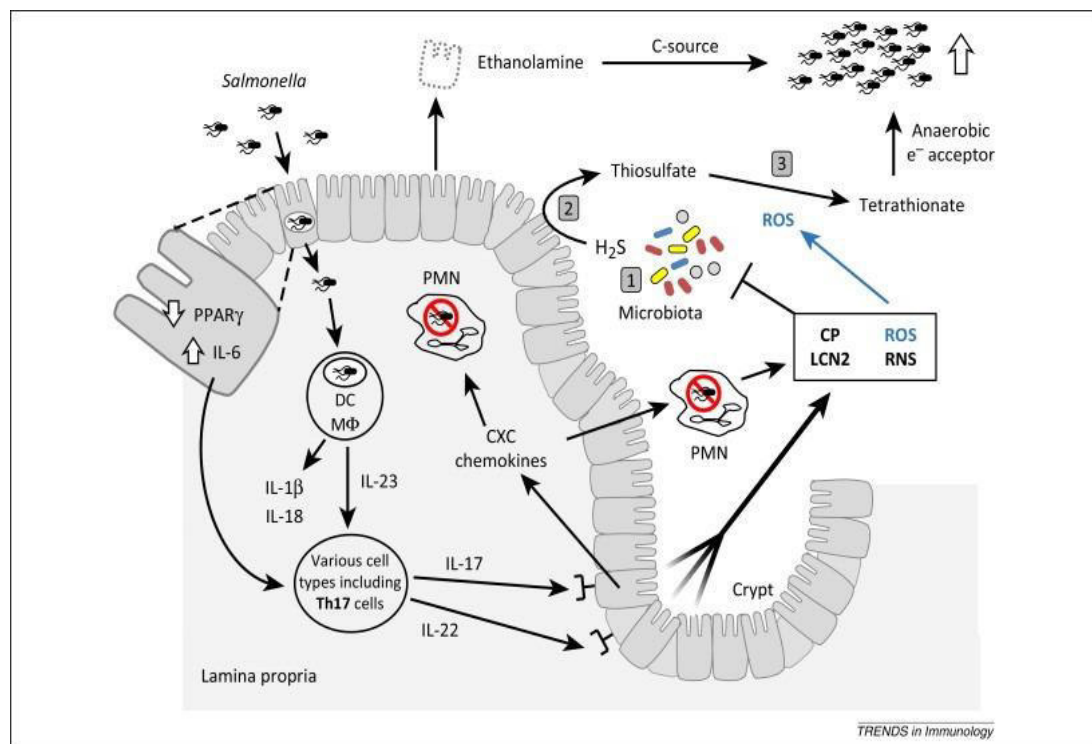
En conjunto, estos estudios apoyan la participación de una variedad de células innatas en el control temprano de la infección por *Salmonella* a través de la fagocitosis y la producción de IFN- γ . Durante la infección temprana por *Salmonella*, los monocitos inflamatorios también son reclutados y se acumulan rápidamente en PP infectados y NLM donde pueden producir factores antimicrobianos como iNOS, TNF- α e IL-1 β (Rydstrom y Wick, 2007). Las células dendríticas (DC) residentes también pueden reconocer el LPS y la flagelina de *Salmonella*, lo que provoca un aumento en la expresión de CCR7, CD80, CD86 y CD40 (McSorley *et al.*, 2002, Salazar *et al.*, 2007). Esta

maduración de la población de DC mejora la capacidad de presentación del antígeno y permite que estas células migren al área de células T del tejido linfoide para iniciar una respuesta inmune adaptativa (Sierro *et al.*, 2001).

2.6.1 Activación temprana de células T en el intestino contra *Salmonella*

Inicialmente, se ha detectado activación de las células T en las PP y luego en los MLN después de la infección oral (Figura 6). Estas células T CD4 específicas de *Salmonella* se activan para expresar la superficie de CD69 dentro de las 3 horas de infección oral y producen niveles máximos de interleucina-2 (IL-2) 9-12 horas más tarde (McSorley *et al.*, 2002).

Figura 6. Respuesta inmunológica en el intestino contra *Salmonella*
(Behnsen *et al.*, 2015)



Estudios adicionales han demostrado que las células dendríticas CD11c+ CCR6+ desempeñan un papel clave en el inicio de las respuestas tempranas de células T específicas de *Salmonella* dentro de las PP (Salazar-Gonzalez, *et al.*, 2006). Esta población de DC se recluta al epitelio asociado al

folículo en respuesta a la producción local de CCL20 que es inducida por la respuesta innata del huésped a la flagelina de *Salmonella* (Sierro *et al.*, 2001).

Durante esta etapa inicial de activación de células T, los MLN de drenaje también sirven como un sitio importante de activación de células T específicas de *Salmonella*. De hecho, las células T activadas específicas de *Salmonella* se pueden detectar en MLN dentro de las 9-12 horas posteriores a la infección, lo que demuestra la notable eficacia de la respuesta inmune inicial a la infección. En este punto de tiempo temprano, la activación de las células T específicas no se detecta en ningún otro tejido linfóide secundario (Salazar-Gonzalez, *et al.*, 2006).

Estudios adicionales apuntan a un importante papel protector del MLN durante la infección, ya que la eliminación de este tejido linfóide se correlaciona con el aumento de las cargas bacterianas y la inmunopatología grave en el hígado de los ratones infectados (Voedischet *et al.*, 2009).

2.6.2 Inmunidad protectora a la infección con *Salmonella*

Después de la eliminación de la infección primaria, los murinos desarrollan una robusta inmunidad protectora contra el desafío secundario. Los estudios que examinan esta inmunidad adquirida sugieren un papel importante para las células T CD4 y CD8 en la eliminación de *Salmonella*. Se indica que los anticuerpos contribuyen a la inmunidad protectora durante la infección secundaria, un estudio reciente que compara ratones deficientes en células B (JhD) con ratones transgénicos que contienen células B que no pueden cambiar de isotipo o secretar anticuerpos, además que las células B pueden jugar un papel protector adicional incluso en ausencia de secreción de anticuerpos (Nanton *et al.*, 2012). Se ha reportado que las células B funcionan como células presentadoras de antígenos y como fuente importante de citoquinas inflamatorias durante la infección por *Salmonella* (Ugrinovic *et al.*, 2003; Barr *et al.*, 2010). Dado que la proliferación inicial de células T específicas contra *Salmonella* implica interacción con DC en el área de células T de los órganos linfoides es probable que el papel de las células B en la

presentación del antígeno requiera señales secundarias después de que se haya producido esta expansión inicial (McSorley *et al.*, 2002).

En conjunto, estos estudios sugieren un papel central de las células T CD4 en la inmunidad adquirida a la infección por *Salmonella* con una contribución adicional importante tanto de las células T CD8 como de las células B. Estudios recientes han intentado caracterizar la respuesta protectora de células T CD4 y CD8 con más detalle. Varios estudios han sugerido un grado desmesuradamente grande de expansión clonal de T CD4 después de la infección inicial con *Salmonella*, de modo que más del 50% de las células T periféricas muestran alguna evidencia de activación y la adquisición de la función efectora (Yrlid *et al.*, 2001; Mittrucker *et al.*, 2002; Srinivasan *et al.*, 2004).

Las poblaciones expandidas de células T también ganan la capacidad de migrar a sitios de tejido no linfoides de replicación bacteriana, como el hígado (Kirby *et al.*, 2004). Por lo tanto, una gran población de células T efectoras específicas contra *Salmonella* se genera después de la infección y algunas de estas células acceden a tejidos no linfoides, presumiblemente para controlar la multiplicación bacteriana. Un estudio reciente ha examinado la estabilidad de la memoria inmune después de la infección primaria y ha sugerido que las células T CD4 específicas de *Salmonella* se mantienen estables durante más de un año después de la infección inicial (Nelson *et al.*, 2013).

Existen estudios que sugieren que las células Th17 pueden jugar un rol protector contra *Salmonella*. Tanto IL-17 como IL-22 se producen en la mucosa intestinal precozmente después de la infección oral (Mitchell *et al.*, 2002). Aunque estas citoquinas pueden ser producidas por otros tipos de células, también se han detectado células Th17 específicas de *Salmonella* en los tejidos de la mucosa (Lee *et al.*, 2012). Después de la infección por *Salmonella*, los ratones deficientes en IL-17 muestran un aumento en la diseminación bacteriana, lo que sugiere que la IL-17 contribuye al mantenimiento de la barrera de la mucosa (Schulz *et al.*, 2008).

La producción de IL-22 intestinal también induce a las células epiteliales intestinales a producir péptidos antimicrobianos como la lipocalina-2, una proteína antimicrobiana que previene la adquisición de hierro bacteriano y es activa contra las bacterias lumenales. Sin embargo, *Salmonella* Typhimurium también posee genes de virulencia implicados en la resistencia a la lipocalina-2 (Santos *et al.*, 2009).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de estudio

La crianza de los cuyes se realizó en las instalaciones del bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria (FMV) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). La inoculación de *S. Typhimurium*, las necropsias de los animales, procesamiento de muestras, aislamiento, identificación de cepas y los métodos de biología molecular se realizaron en la sección de Biología y Genética Molecular del Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria FMV-UNMSM, durante la segunda mitad del año 2016 y 2017.

3.2 Material experimental

Se emplearon como sujetos de estudio a 33 cuyes destetados de 15 a 30 días de edad. Los cuyes fueron adquiridos mediante el Programa de Investigación y Proyección Social en Animales Menores de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Previo al desarrollo del experimento, los animales tuvieron un periodo de acondicionamiento en el bioterio de la FMV – UNMSM durante 10 días. Los animales recibieron las mismas condiciones de crianza que su lugar de procedencia. Fueron divididos en cuatro pozas de crianza: A (8 animales), B (8 animales), C (8 animales) y D (9 animales) por motivo de densidad de animales por poza.

3.3 Cepa *Salmonella* Typhimurium

Para la inoculación de los animales, se utilizó una cepa de *S. Typhimurium* procedente del cepario del laboratorio de FMV-UNMSM (Unidad de Biología y Genética molecular) y preservada en glicerol al 20% a -80°C. La cepa aislada corresponde a un cuy fallecido con signos compatibles con salmonelosis clínica, procedente de una granja de crianza comercial en Pachacamac-Lima durante el mes de enero de 2016. El aislamiento e identificación de *Salmonella* fue realizado según los estándares de la norma ISO 6579 (2002).

Adicionalmente, esa cepa fue confirmada mediante técnicas moleculares e identificación de los genes *invA* y *fliC*, según el protocolo de Jamshidi *et al.* (2010) estandarizado en el laboratorio. La reactivación de la cepa se realizó en el mismo laboratorio en caldo APT a 37°C por 24 horas.

3.4 Inoculación experimental

En el día 10 de acondicionamiento (un día antes de iniciar la inoculación), se sacrificaron 3 animales (uno correspondiente a cada poza A, B y C) mediante el uso de Halatal (Pentobarbital sódico 6.5g). Estos animales fueron utilizados como sujetos calibradores/normalizadores. La inoculación se realizó a 21 cuyes (A=7, B=7 y C=7) con una dosis infectiva para *S. Typhimurium* de 10^2 UFC/ml vía intraperitoneal (IP) suspendido en 1 ml de *PBS* (procedimiento según Panda *et al.*, 2014). Mientras que en la poza “D”, 7 animales fueron inoculados con la cepa muerta por ebullición y finalmente 2 cuyes fueron apartados sin recibir inoculación alguna (centinelas).

3.5 Toma de muestra

Se tomaron 4 cuyes muestra (uno de cada poza) los días 0, 1, 3, 5, 7, 9, 15 y 30 post-infección, siendo los 3 primeros los animales inoculados (A, B y C) y el cuarto de la poza D. Previa anestesia utilizando Ket-A-Xil (Intramuscular, a razón de 5-10mg ketamina/kg, 1-2mg xilazina/kg y 0.05-0.1mg atropina/kg), se procedió a extraer la sangre entera vía intracardiaca un promedio de 3ml y se colocó en un tubo con *EDTA*. Posteriormente se obtuvo la interfase de células mononucleares de sangre periférica, mediante el uso de *Ficoll-Paque*TM (Sigma, St Louis, MO, USA). Se obtuvieron un total de 28 muestras.

3.6 Extracción de ARN

Para la extracción de ARN a partir de las muestras de sangre, se utilizó un choque término. Se agregó nitrógeno líquido en un recipiente y se colocó cuidadosamente las muestras en viales. Inmediatamente se llevó al *Heat Block* (Thermo Scientific) a 56°C. Este procedimiento se repitió 3 veces.

Luego, se centrifugaron las 28 muestras a 12000g por 15 min a una temperatura de 4°C. Al finalizar se separó el sobrenadante y se colocó en otro recipiente donde se obtuvo un aproximado de 200ul de muestra. Finalmente, la extracción del ARN se realizó según el protocolo utilizando *Trizol® Reagent* (Thermo Fisher Scientific, USA).

Antes de la evaluación se procedió a la cuantificación de la concentración de ARN en cada muestra fue realizada utilizando el kit *Qubit® RNA HS Assay Kits* (Thermo Scientific). Para la lectura se utilizó el equipo de cuantificación *Qubit® 3.0 fluorometer* (Thermo Fisher Scientific).

3.7 PCR tiempo real

Para la síntesis de ADNc se utilizó el kit *Revertaid RT Reverse Transcription* (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. El RT PCR en tiempo real fue realizado en un termociclador *PikoReal 96* (Thermo Scientific) usando como fluoróforo Máxima SYBR Green. Se utilizaron los componentes y condiciones descritos en los cuadros 3 y 4. Se determinó el perfil citocínico Th1, Th2 y Th17 en los cuye inoculados experimentalmente con *S. Typhimurium* utilizando los *primers* señalados en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Cebadores de citoquinas utilizados, temperatura de *annealing*, tamaño y referencia.

GEN			SECUENCIA	Ta	bp	Referencia
INTERLEUCINAS	HK GAPDH	F	CGGATTTGGCCGTATTGG	60	63	Yamada et al, 2005
		R	AATATCCACTTTGCCAGACATGAA			
	IL-12p40	F	TCTGAGCCGGTCACAACTGC	60	295	Yamada et al, 2005
		R	AGGCGCTGTCCTCCTGACAC			
	TNF- α	F	ATCTACCTGGGAGGCGTCTT	60	183	Yamada et al, 2005
		R	GAGTGGCACAAGGAAGTGGT			
	IFN- γ	F	GACCTGAGCAAGACCCTGAG	60	170	Yamada et al, 2005
		R	GCCATTTGCGCTGACATATT			
	IL2	F	CCACAGAATTGAAACATCTTCAGTG	60	234	Scarozza et al, 1998
		R	CTTTGACAAAAGGTAATCCATCTGTTTCAG			
	IL-4	F	TAT TGA TGG GTC TGG TGC CC	58	129	En este estudio ¹
		R	TGG AGA GTG TGT TGA GGT GC			
	IL10	F	GGTTGCCAAGCCTTATCGGA	60	190	En este estudio ²
		R	ACCTGCTCCACTGCCTTGCT			
	TGF- β 1	F	CAT CGA TAT GGA GCT GGT GAA G	60	70	Allen y Murray, 2003
		R	GCCGTAATTTGGACAGGATCTG			
	IL-17	F	CTG ATG GCT ACA GTG AAG GC	62	103	En este estudio ³
		R	GGT TGA GCT TGA CAT TCT GG			

¹IL-4 Genbank NM 001257263. ²IL10 Genbank NM 001260485. ³IL-17 Genbank NM 001278768.

Cuadro 3. Componentes para la qPCR

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen inicial
Máxima SYBR Green	2X	X	10uL
Forward Primer	10uM	0.375uM	0.75uL
Reverse Primer	10uM	0.375uM	0.75uL
Agua			6.5uL
Template cDNA			2uL
			20uL

Cuadro 4. Condiciones para la qPCR según gen a evaluar

	Temperatura	Tiempo	Repeticiones
T _{UDG}	50°C	2min	
T _D	95°C	10min	1
T _D	95°C	30sec	
T _A	X°C	30sec	40
T _E	72°C	30sec	
Melt Curve	X-95°C		1

T_{UDG}: Temperatura de incubación con UDG

3.8 Cuantificación relativa

Para el análisis de los niveles de expresión de las citoquinas fue utilizado el método del Ct comparativo (Livak y Schmittgen, 2001), que permite comparar las curvas de amplificación de las citoquinas producidas. Esta aproximación sigue la siguiente fórmula:

$$N = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

N = Cantidad relativa de ARN_m con respecto al calibrador

$\Delta\Delta Ct$ = Diferencia entre el control endógeno y el ARN_m a analizar con respecto al calibrador.

3.9 Histopatología

Adicional y posterior a la extracción de muestras, se realizó la necropsia de cada animal verificando lesiones macroscópicas que confirmen la infección, además se obtuvo fragmentos de Intestino delgado, hígado, bazo, nódulo linfático mesentérico, pulmones y cerebro para histopatología (coloración HE); posteriormente se realizaron las observaciones en microscopio de luz Carl Zeiss (Alemania) en menor, mediano y mayor aumento (40X, 100X y 400x respectivamente).

3.10 Recuento bacteriano en heces

Se realizó en el Laboratorio de Biología y Genética de la Facultad de Medicina Veterinaria UNMSM inmediatamente después de la necropsia de cada animal. Se procesaron un total de 28 muestras para el recuento en Agar XLD, para ello antes de la siembra se realizó las diluciones sucesivas al décimo. La incubación se realizó por 24 horas a 37°C.

3.11 Aislamiento y siembra en Agar XLD

Se colectaron tejidos de hígado, bazo, intestino, ciego y cerebro. El medio de crecimiento que se utilizó fue caldo APT durante 24 horas a 37°C, luego la siembra se hizo en agar XLD.

3.12 Análisis estadístico

El presente estudio es de carácter descriptivo, por lo que los resultados del comportamiento del perfil citocínico en cobayos inoculados con *S. Typhimurium* durante los 30 días post-inoculación serán mostradas mediante figuras y cuadros descriptivos.

3.13 Consideraciones éticas

El presente trabajo fue aprobado para su realización por el Comité de Ética y Bienestar Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, según Constancia de Autorización Ética N°2016-005.

IV. RESULTADOS

4.1 PCR en tiempo real (qPCR)

4.1.1 Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)

Realizadas las corridas de PCR tiempo real para la amplificación de un segmento de ARN mensajero de GAPDH, se muestra un producto específico evidenciado por la curva de amplificación. Las temperaturas melting oscilan entre 78.94°C y 79.96°C, con un promedio de 79.27°C y una desviación estándar de 0.16°C. Luego se procedió a obtener valores Ct (ciclo umbral, Cq en la lectura del termociclador) del gen GAPDH para los días 0, 1, 3, 5, 7, 9, 15 y 30 (Cuadro 5).

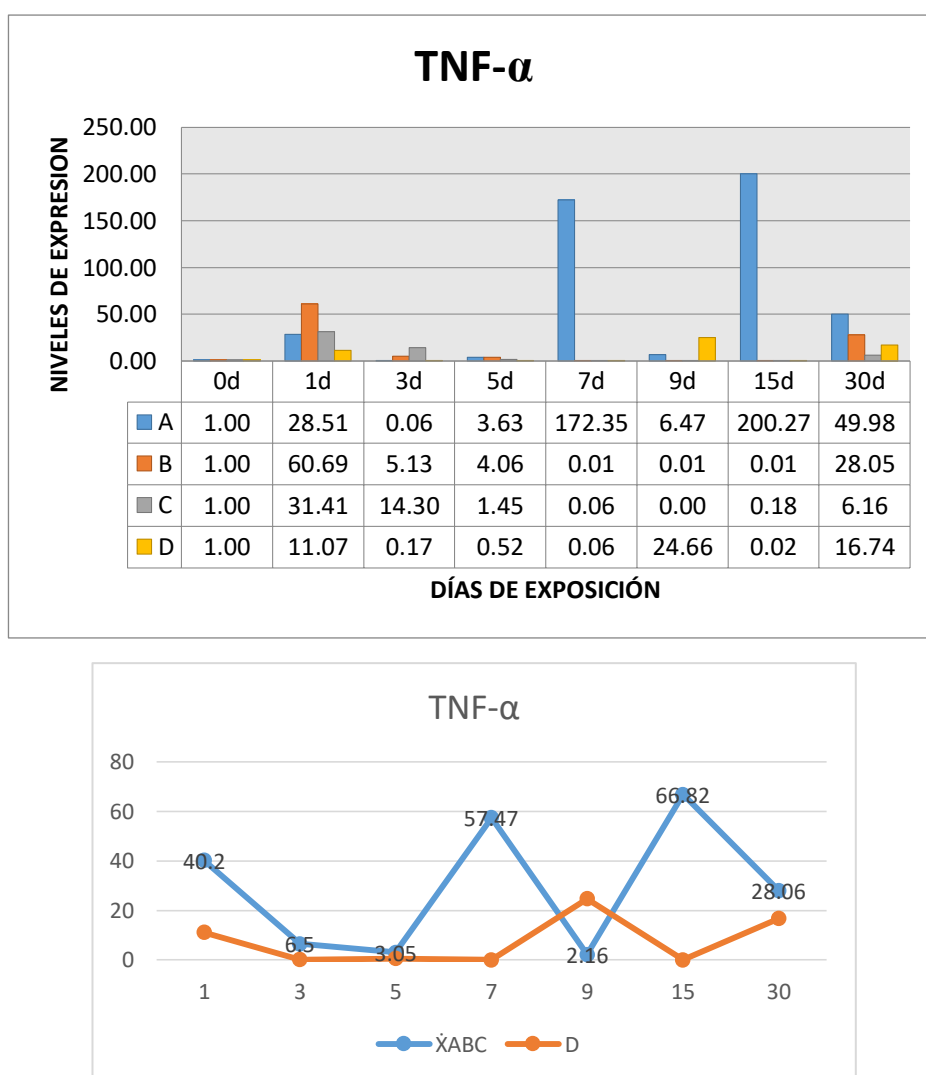
Cuadro 5. Valores Cq del gen GAPDH según días post-inoculación.

GRUPO DIAS	A	B	C	D
0	25.80	29.49	25.30	26.86
1	30.12	30.96	33.19	25.78
3	30.95	31.29	27.02	33.11
5	29.02	29.76	26.51	25.91
7	33.54	30.00	31.40	31.65
9	33.50	23.43	23.43	32.36
15	31.66	30.05	32.98	30.05
30	31.95	32.85	29.18	27.97

4.1.2 Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α):

Realizadas las corridas de PCR tiempo real para la amplificación de un segmento de ARN mensajero de TNF- α , se muestra un producto específico evidenciado por la curva de amplificación. Las temperaturas melting oscilan entre 83.58°C y 84.68°C. El promedio de T° de Melting de las muestras fue 84.18°C y la desviación estándar fue de 0.18°C. El análisis de cuantificación relativa muestra expresiones para los días 0, 1, 3, 5, 7, 9, 15 y 30 (Figura 7).

Figura 7. Expresión relativa de TNF- α según días post-inoculación.

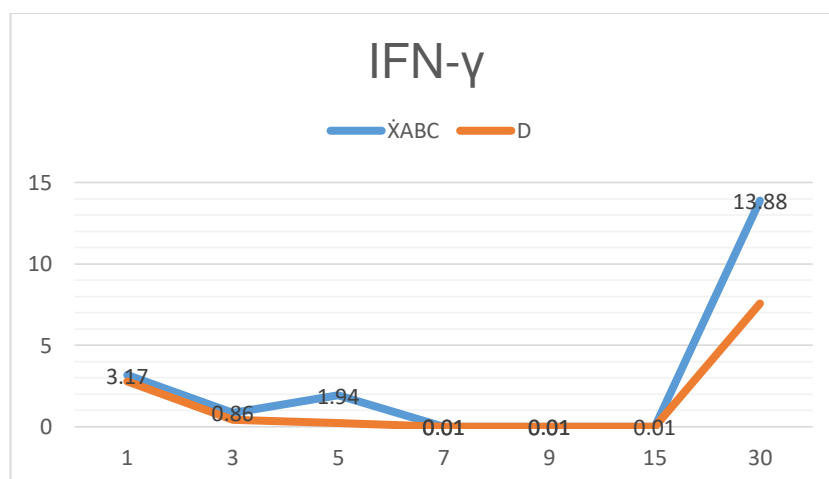
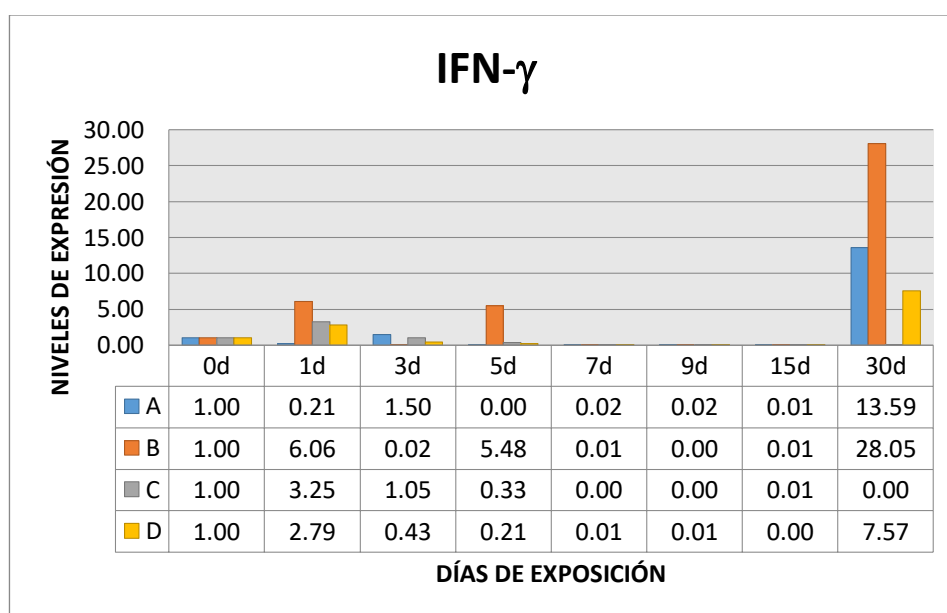


Se muestra una expresión aumentada el primer día en promedio de 40.2 veces más que el calibrador, luego va disminuyendo hasta el día 5 para aumentar hacia el día 7 hasta 57.47 veces. El día 9 disminuye hasta 2.16 veces. Posteriormente el día 15 hay un incremento en promedio de 66.82 veces, con una alta variabilidad entre los grupos. En el "D" las expresiones están aumentadas los días 9 y 30 post-inoculación.

4.1.3 Interferón Gamma (IFN- γ)

Realizadas las corridas de PCR tiempo real para la amplificación de un segmento de ARN mensajero de IFN- γ , se muestra un producto específico evidenciado por la curva de amplificación. Fueron hallados dos promedios de T° de melting de las muestras las cuales fueron 78.70°C (78.18-78.99°C) y 79.21°C (79.00-79.98°C), mientras la desviación estándar fue de 0.24 °C y 0.18°C respectivamente. El análisis de cuantificación relativa muestra expresiones para los días 0, 1, 3, 5, 7, 9, 15 y 30 post-inoculación (Figura 8).

Figura 8. Expresión relativa de IFN- γ según días post-inoculación.

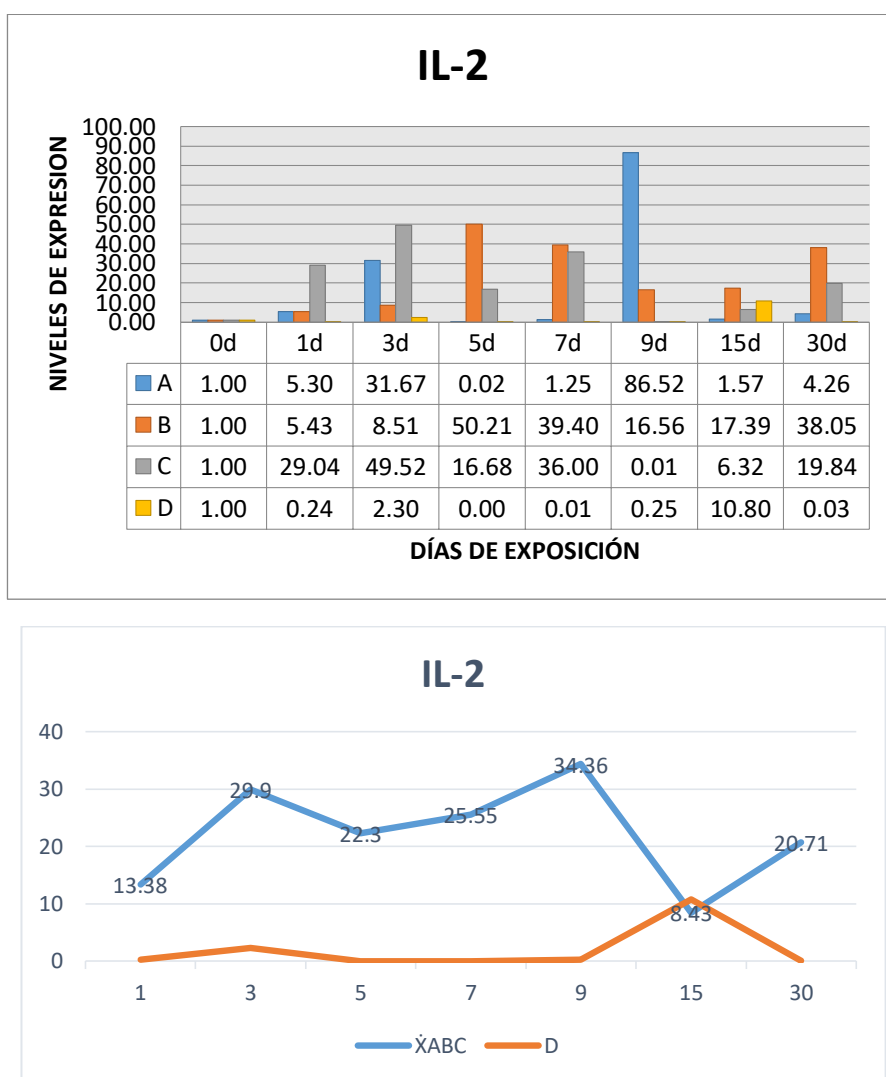


El primer día una expresión de 3.17 veces más que el calibrador y se va reduciendo hasta el día 15, luego se observa un incremento en promedio de 13.88 veces, también hubo un incremento con los inoculados con bacterias muertas.

4.1.4 Interleucina 2 (IL-2)

Realizadas las corridas de PCR tiempo real para la amplificación de un segmento de ARN mensajero de IL-2, se muestra un producto específico evidenciado por la curva de amplificación. Fueron hallados dos promedios de T° de melting de las muestras las cuales fueron 72.19°C y 73.65°C y con desviaciones estándar de 0.19°C y 0.17°C, respectivamente. El análisis de cuantificación relativa muestra expresiones para los días 0, 1, 3, 5, 7, 9, 15 y 30 (Figura 9).

Figura 9. Expresión relativa de IL-2 según días post-inoculación.

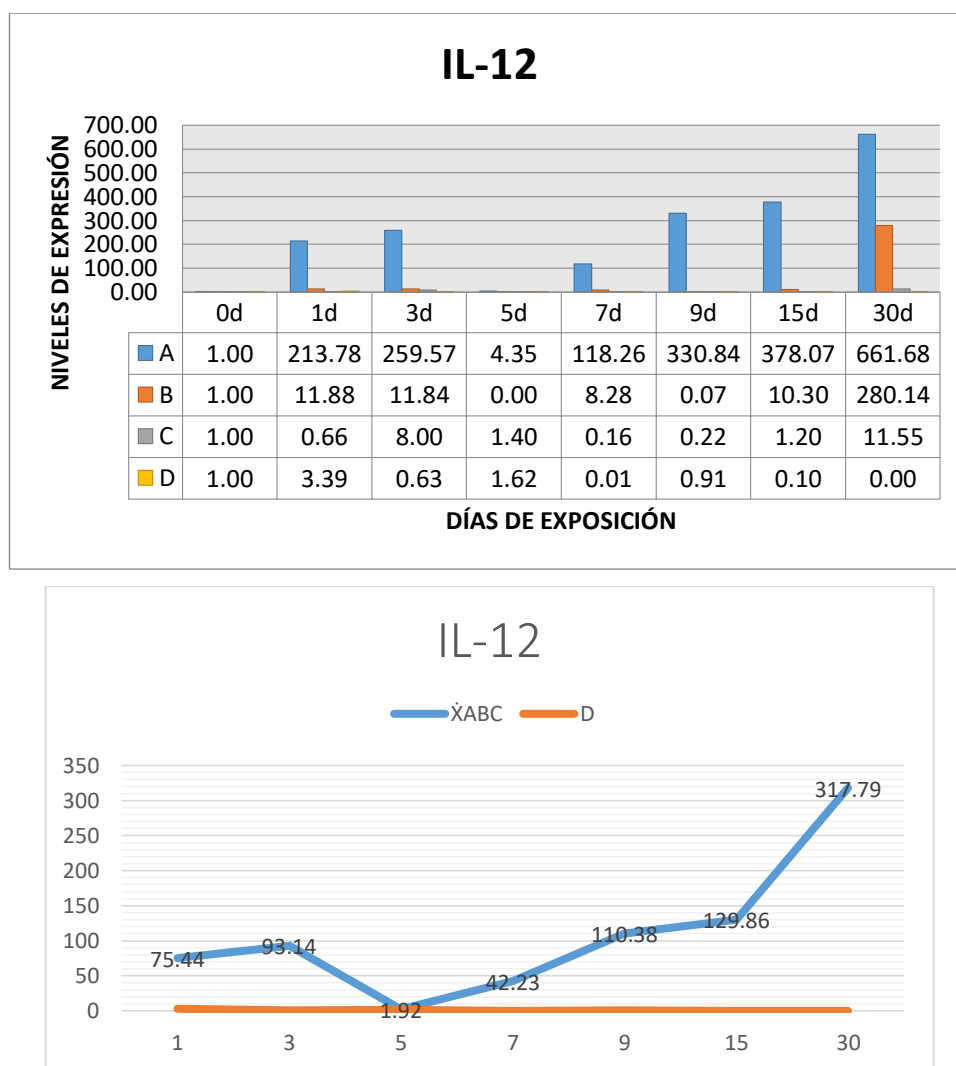


Se muestra una expresión en el primer día de 13.38 veces más que el calibrador y que va en aumento hasta el día 30, siendo el día 9 el máximo valor. En los inoculados con bacterias muestras sólo obtuvimos un incremento el día 15.

4.1.5 Interleucina 12 (IL-12)

Realizadas las corridas de PCR tiempo real para la amplificación de un segmento de ARN mensajero de IL-12, se muestra un producto específico evidenciado por la curva de amplificación. Resultaron cuatro temperaturas de melting promedio: 78.70°C, 79.29°C, 80.35°C y 81.46°C con desviaciones estándar de 0.24°C, 0.22°C, 0.17°C y 0.21°C respectivamente. El análisis de cuantificación relativa muestra las expresiones para los días 0, 1, 3, 5, 7, 9, 15 y 30 (Figura 10).

Figura 10. Expresión relativa de IL-12 según días post-inoculación.

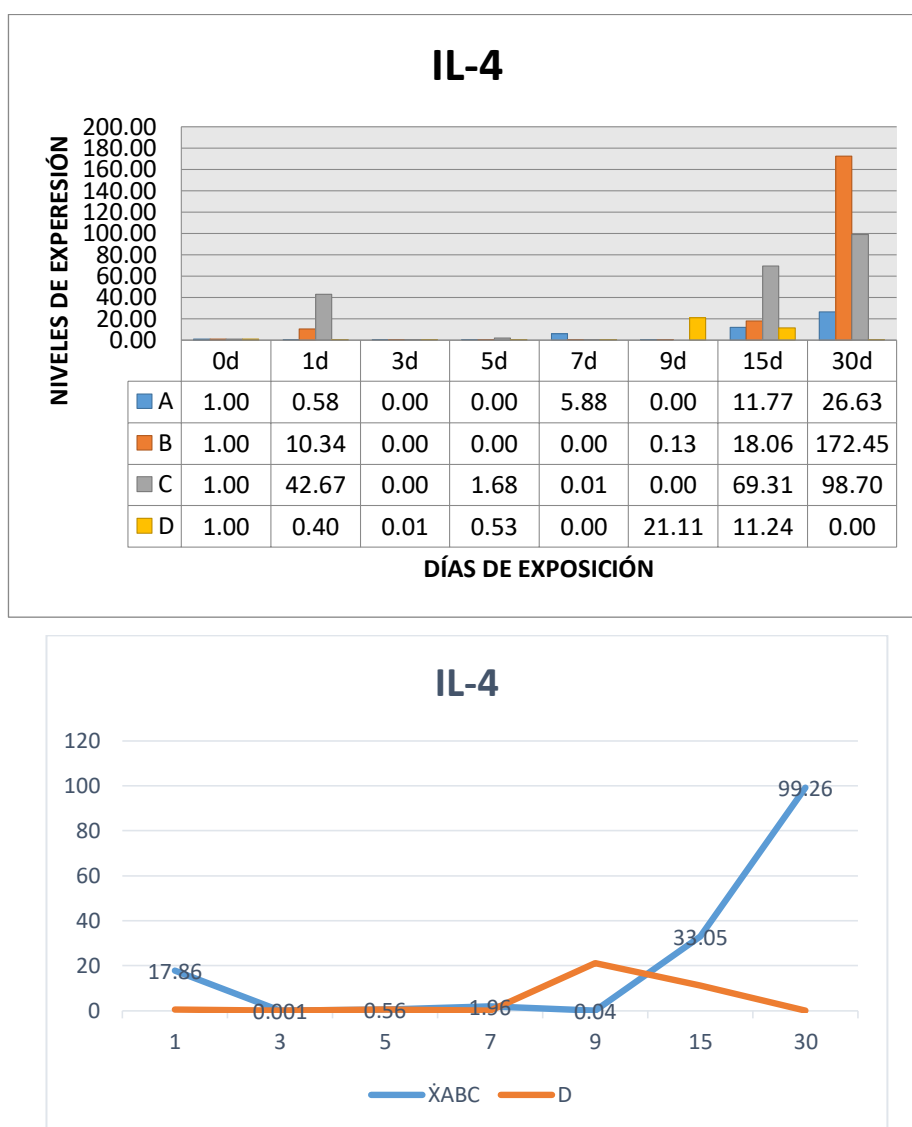


El día 1 se muestra una expresión de 75.44 veces más que el calibrador y que va aumentado día a día hasta llegar a un valor de 317.79 veces más (día 30). En el grupo "D" los valores se mantuvieron con expresiones mínimas.

4.1.6 Interleucina 4 (IL-4)

Realizadas las corridas de PCR tiempo real para la amplificación de un segmento de ARN mensajero de IL-4, se muestra un producto específico evidenciado por la curva de amplificación y una temperatura melting promedio de 75.38°C, con una desviación estándar de 0.22°C. El análisis de cuantificación relativa muestra expresiones para los días 0, 1, 3, 5, 7, 9, 15 y 30 (Figura 11).

Figura 11. Expresión relativa de IL-4 según días post-inoculación.

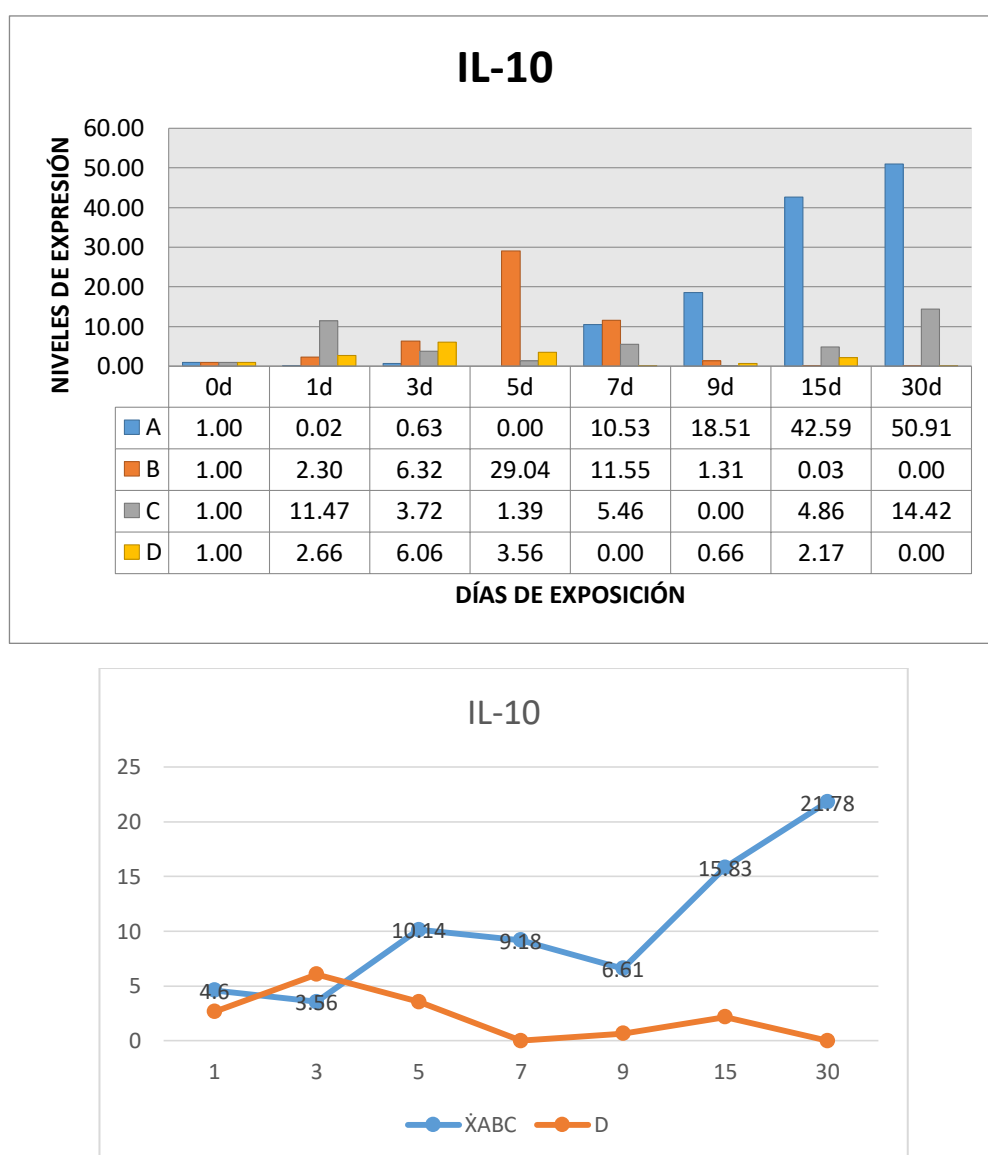


Se muestra una expresión en el primer día de 17.86 veces más que el calibrador, luego se reduce hasta el día el día 9. Posteriormente hay un incremento en promedio de 99.26 veces hacia el día 30 pi. En el “D” las expresiones son menores.

4.1.7 Interleucina 10 (IL-10)

Realizadas las corridas de PCR tiempo real para la amplificación de un segmento de ARN mensajero de IL-10, se muestra un producto específico evidenciado por la curva de amplificación. Resultaron tres temperaturas de melting promedio: 75.49°C, 76.26°C y 77.18°C, con desviaciones estándar de 0.24°C, 0.18°C y 0.16°C respectivamente. El análisis de cuantificación relativa muestra expresiones para los días 0, 1, 3, 5, 7, 9, 15 y 30 (Figura 12).

Figura 12. Expresión relativa de IL-10 según días post-inoculación.

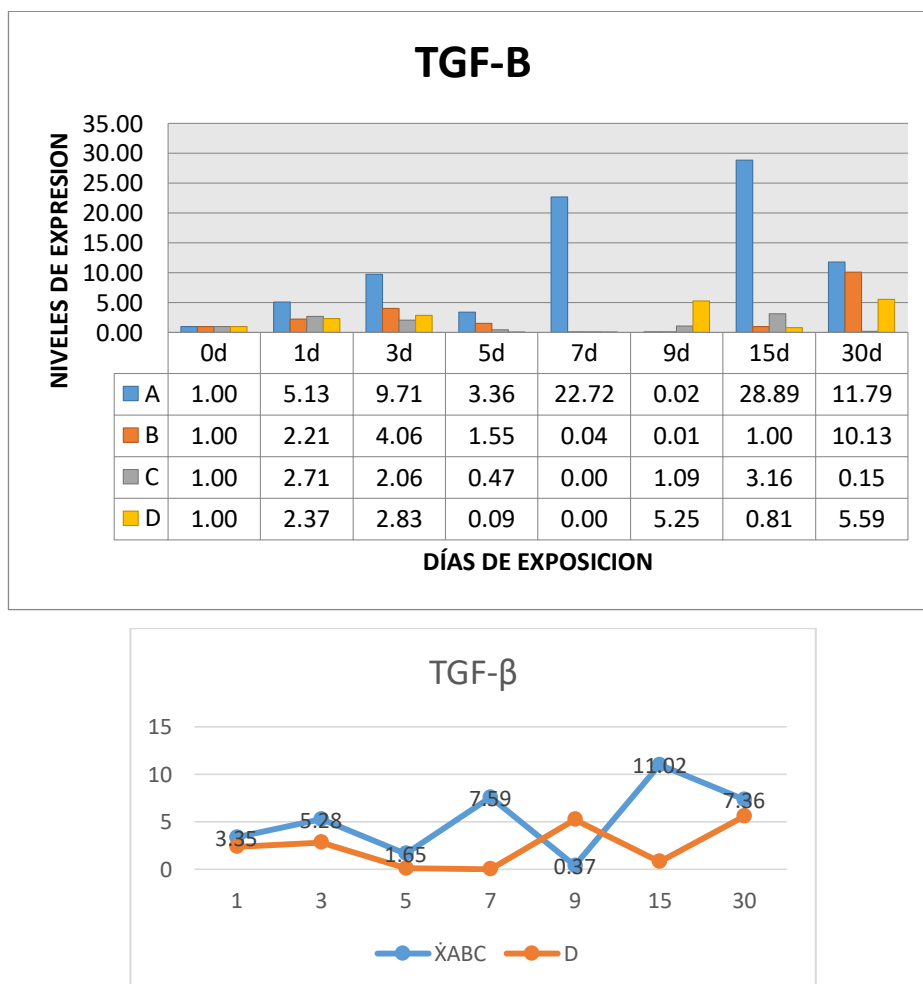


Se muestra una expresión el día 1 de 4.6 veces más que el calibrador y que se va incrementando hasta el día 30 (21.78 veces). No hubo incremento en el grupo "D".

4.1.8 Factor de Crecimiento transformante Beta (TGF- β):

Realizadas las corridas de PCR tiempo real para la amplificación de un segmento de ARN mensajero de TGF- β , se muestra un producto específico evidenciado por la curva de amplificación. Las temperaturas melting oscilan entre 80.48°C y 81.53°C. El promedio de T° de Melting fue 81.09°C y la desviación estándar fue de 0.26°C. El análisis de cuantificación relativa muestra una expresión para los días 0, 1, 3, 5, 7, 9, 15 y 30 post-inoculación (Figura 13).

Figura 13. Expresión relativa de TGF- β según días post-inoculación.

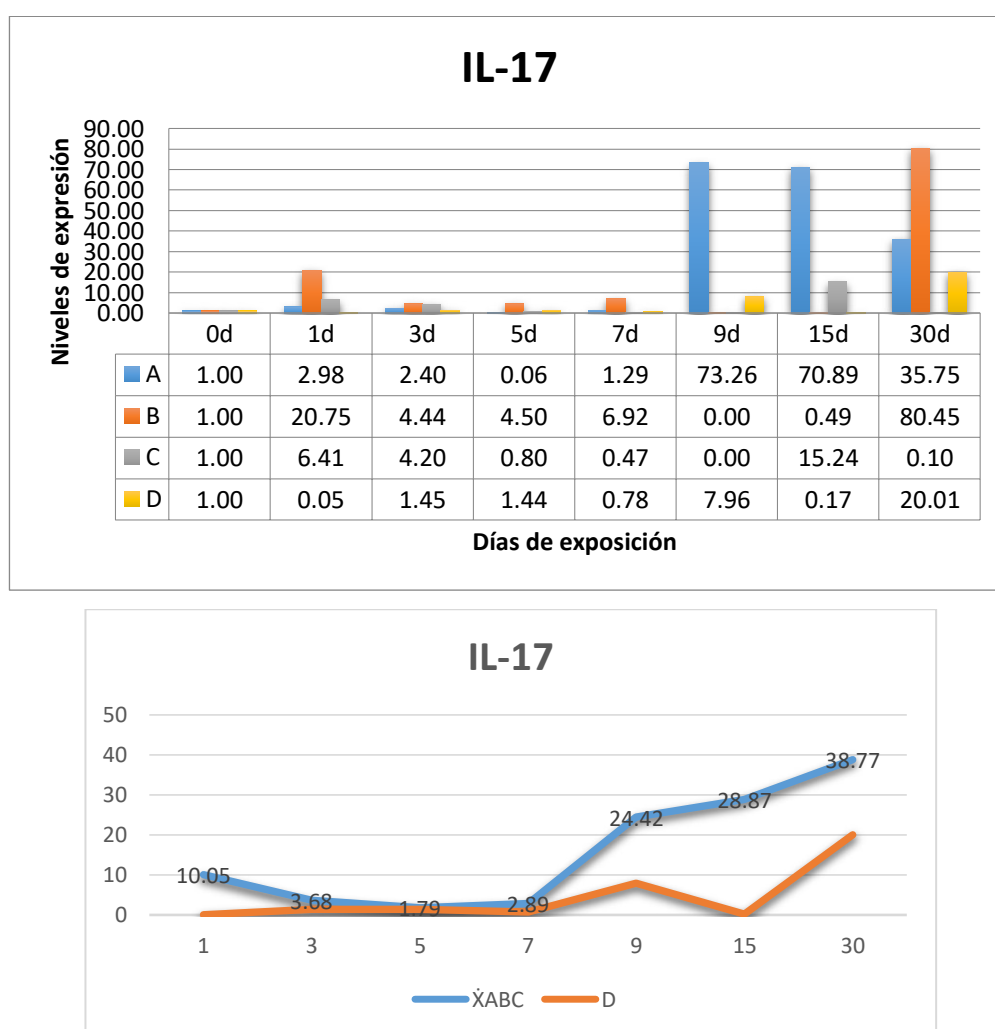


Se muestra una expresión aumentada al día 3 en promedio de 5.28 veces más que el calibrador, luego se reduce el día 5 para aumentar hacia el día 7 hasta 7.59 veces. El día 9 disminuye hasta 0.37 veces. Posteriormente el día 15 hay un incremento en promedio de 11.02 veces, con una alta variabilidad entre los grupos. En el "D" las expresiones están aumentadas los días 9 y 30 post-inoculación.

4.1.9 Interleucina 17 (IL-17)

Realizadas las corridas de PCR tiempo real para la amplificación de un segmento de ARN mensajero de IL-17, se muestra un producto específico evidenciado por la curva de amplificación. Resultaron dos temperaturas de melting promedio 78.90°C, 79.42°C, con desviaciones estándar de 0.08°C y 0.19°C respectivamente. El análisis de cuantificación relativa muestra expresiones para los días 0, 1, 3, 5, 7, 9, 15 y 30 post-inoculación (Figura 14).

Figura 14. Expresión relativa de IL-17 según días post-inoculación.



Se muestra una expresión en el primer día en promedio de 10.05 veces más que el calibrador, que se va reduciendo hasta el día 7 (2.89). Posteriormente el día 9 hay un incremento de 24.42 veces, y hasta el día 30 (38.77 veces más que el calibrador). Hay una variabilidad entre los grupos. En el "D" las expresiones aumentaron el día 9 y 30 post-inoculación.

4.2 Histopatología

Las lesiones anatomopatológicas de los cuyes se observaron los días 1, 3, 5, 7, 9, 15 y 30 post-inoculación de los 21 cuyes inoculados con *S. Typhimurium*.

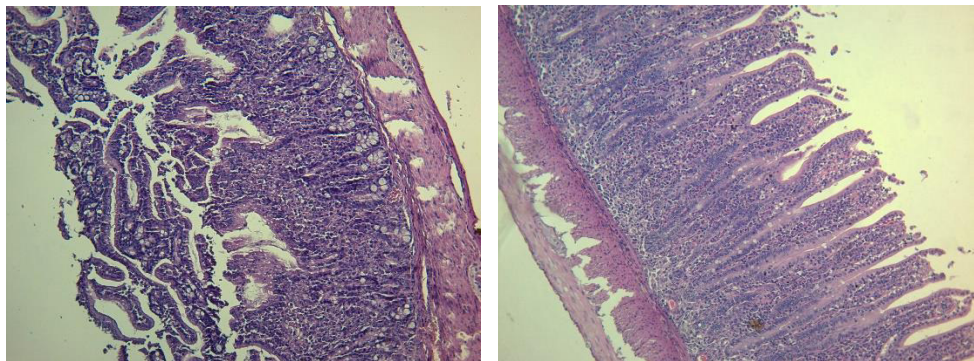
4.2.1 Intestino delgado

Cuadro 6. Histopatología del intestino delgado (día 1, 3, 5, 7, 9, 15 y 30).

Día	Lesiones importantes
1	Inflamación de tipo catarral e hiperplasia de las vellosidades intestinales.
3	Inflamación de tipo catarral con presencia de linfocitos y células mononucleares.
5	Exfoliación de células epiteliales y vellosidades y reacción inflamatoria (presencia de linfocitos y células plasmáticas). En un animal notó una pequeña vesícula aparentemente coccidia (Figura 15).
7	Descamación de células y vellosidades es ligera, pero aún tenemos abundante presencia de mononucleares. En un animal presencia de abundantes glóbulos rojos en intersticio (inflamación de tipo hemorrágica).
9	Abundante presencia de mononucleares, ligera descamación de vellosidades.
15	Reacción inflamatoria de tipo catarral y fibrino-serosa.
30	Presencia de mononucleares e hiperplasia de enterocitos y glándulas de Lieberkühn (Figura 15).

Al primer día post-inoculación a la necropsia se observó el órgano levemente congestionado. Los siguientes días la mayoría presentaba intestino congestionado y en algunos casos timpanizados, mientras que para el día 30 el contenido intestinal era poco, no había congestión.

Figura 15. Intestino, día 5 y 30 post-inoculación (10X).



Hiperplasia de vellosidades y glándulas de Lieberkühn.

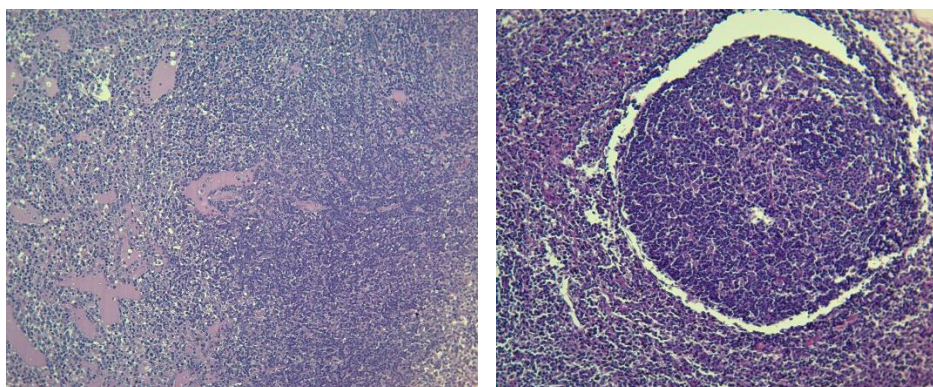
4.2.2 Nódulo linfático mesentérico

Cuadro 7. Histopatología del linfonódulo mesentérico.

Día	Lesiones importantes
1, 3 y 5	Aumento de tamaño de los folículos linfoides e infiltración de linfocitos.
7 y 9	No se observó folículos, sin embargo había presencia de mononucleares.
15	Presencia de 1 sólo folículo con abundantes células mononucleares y presencia de acumulaciones de fibrina.
30	Irregularidad la morfología folicular e infiltración de mononucleares en abundancia.

A la necropsia en los días 1, 3 y 5 se observó agrandado. Esto continuó hasta el día 30 donde también se observó aumentado en tamaño y de color pálido.

Figura 16. Linfonódulo mesentérico, día 7 y 15 post-inoculación.
(10X y 40X respectivamente)



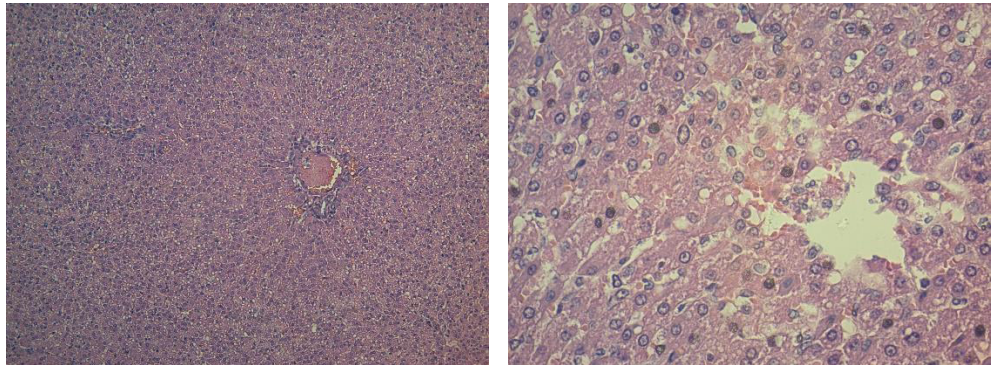
4.2.3 Hígado

Cuadro 8. Histopatología del hígado.

Día	Lesiones importantes
1	Pérdida de arquitectura celular de los hepatocitos (Figura 17).
3	Necrosis de tipo coagulativa, hiperplasia de conductos biliares, células de Kupffer hinchadas y secuestro de glóbulos rojos en sinusoides (Figura 17).
5	Inflamación intersticial y acumulación de fibrina, además en un animal presencia de vacuolas de grasa (esteatosis).
7 y 9	Inflamación de tipo fibrinosa y periportal con presencia de infiltración de células mononucleares, también presencia de glóbulos rojos en sinusoides (Figura 18).
15 y 30	Inflamación intersticial y acumulación de fibrina. Infiltración de células mononucleares, también presencia de glóbulos rojos en sinusoides y esteatosis hepática (Figura 18).

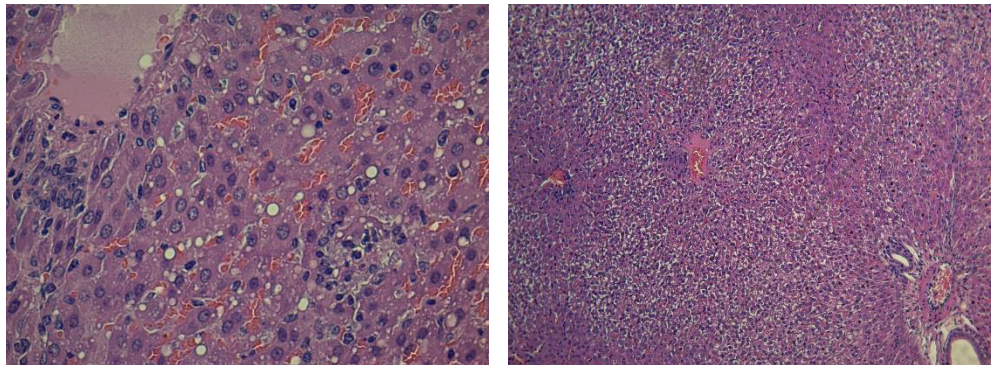
El día 1 post-inoculación no se presenciaron anomalías macroscópicas, esto ocurrió a partir del día 3 cuando ya se observaron puntos blanquecinos a nivel de este órgano y cápsula engrosada.

Figura 17. Hígado, día 1 y 3 post-inoculación.
(10X y 40X respectivamente)



Pérdida de arquitectura lobulillar y necrosis coagulativa.

Figura 18. Hígado, día 7 y 30 post-inoculación.
(40X y 10X respectivamente)



Inflamación periportal, infiltración de células mononucleares y presencia de vacuolas de grasa.

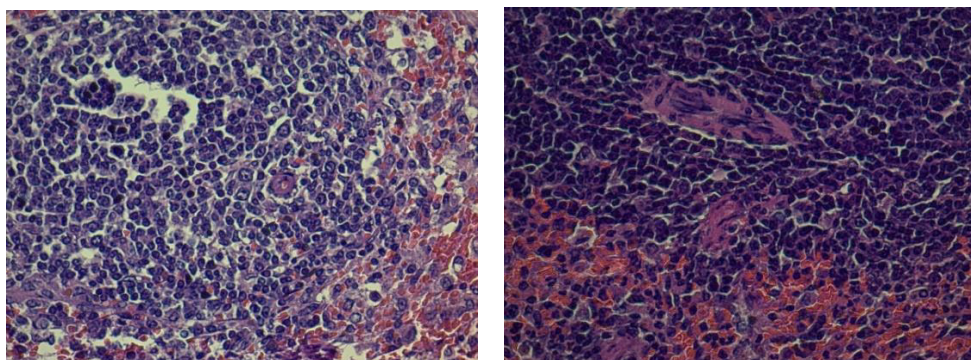
4.2.4 Bazo

Cuadro 9. Histopatología del bazo.

Día	Lesiones importantes
1	No se observó lesiones importantes.
3 y 5	Irregularidad en su morfología medular, además depresión linfoide con hemorragia y periesplenitis (Figura 19).
7	Desaparición de los folículos linfoides con la presencia de inflamación de tipo fibrinosa.
9	Abundante presencia de células mononucleares y con predominio de glóbulos rojos en pulpa roja.
15	Desaparición e irregularidad de la pulpa esplénica, esplenitis con depresión linfoide y con hemorragia.
30	La gran infiltración de células mononucleares (Figura 19)

Al primer día, 1 de los 3 cuyes presentó el bazo agrandado, sin embargo en los demás días, la mayoría presentó el órgano aumentado de tamaño. El día 30 post-inoculación se observó su capsula blanquecina sin aumento de tamaño.

Figura 19. Bazo día 5 y 30 post-inoculación (40X).



Depresión linfoide y gran infiltración de células mononucleares.

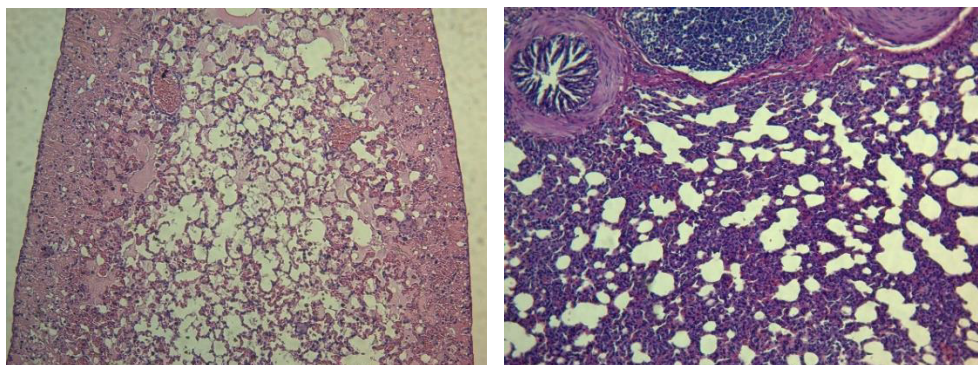
4.2.5 Pulmón

Cuadro 10. Histopatología del pulmón

Día	Lesiones importantes
1	Aumento de linfocitos y células plasmáticas en intersticio.
3	Pérdida de paredes alveolares.
5	Inflamación de tipo catarral en bronquios e infiltrado celular en intersticio.
7	Neumonitis, congestión generalizada y presencia de fibrina entre los alveolos.
9 y 15	Edema pulmonar, descamación de la mucosa bronquial, presencia de glóbulos rojos en las paredes alveolares y fibrina (Figura 20).
30	Rotura de paredes alveolares y secuestro de eritrocitos, edema pulmonar y neumonía intersticial a mononucleares.

Este órgano a la necropsia se encontró aparentemente normal sin embargo a nivel tisular se encontraron lesiones importantes como el edema pulmonar.

Figura 20. Pulmón día 7 (10X) y 15 (40X) post-inoculación.



Edema pulmonar y presencia de fibrina en alveolos

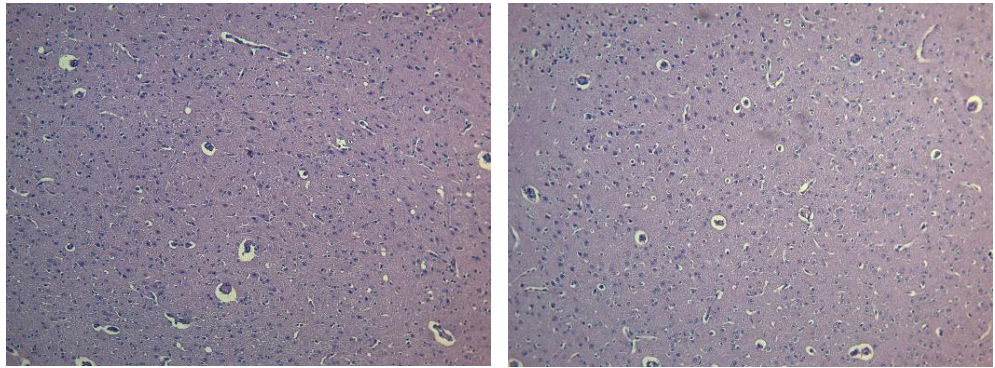
4.2.6 Cerebro

Cuadro 11. Histopatología del cerebro a partir del día 5.

Día	Lesiones importantes
5	Vacuolización del espacio perivascular y presencia de algunos neutrófilos en meninges (Figura 21).
7	Edema perineural por muerte de neuronas y aumento de los espacios perigliales. Presencia de neurofagia (células glía junto a neurona).
9	Microtrombosis en capilar sanguíneo.
15	Edema perineural por muerte de neuronas y aumento de los espacios perigliales. Presencia de neurofagia.
30	Vacuolización, edema perineural y aumento de espacios perigliales por cambios post-morten (Figura 22).

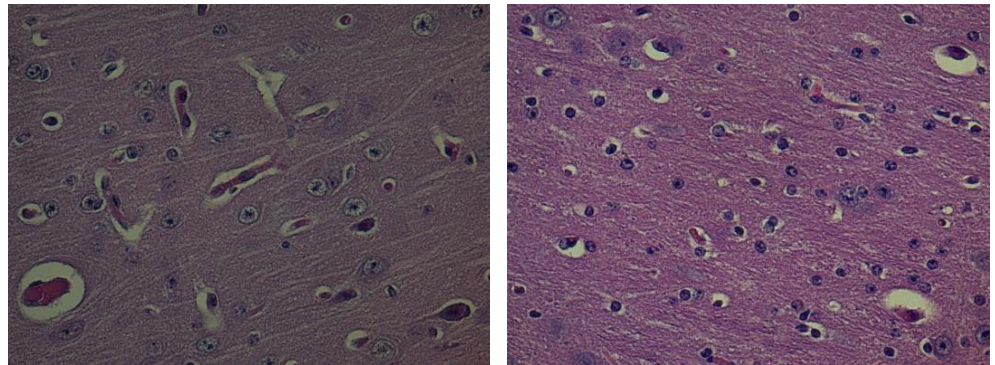
Este órgano en un inicio no se iba a considerar para la histopatología, sin embargo a partir del día 4 post-inoculación se observó un comportamiento epiléptico en algunos cuyes, caminaban en círculos y en algunos hubo parálisis del tren posterior, es por ello que se inicia a recolectar muestras de este tejido.

Figura 21. Cerebro día 5 y 7 post-inoculación (10X).



Vacuolización del espacio perivascular.

Figura 22. Cerebro día 15 y 30 post-inoculación (40X).



Aumento de espacios perigliales.

III. DISCUSIÓN

Los cuyes utilizados fueron evaluados por 10 días desde que llegaron a las instalaciones del bioterio, tratando de no manipular o estresar demasiado a los animales. También se recolectaron las heces día a día de cada poza dando negativo cada lectura a *Salmonella*, es por ello que no se administró antibiótico alguno.

Mediante el uso de una técnica de PCR en tiempo real, se evaluó la cinética de la expresión del ARNm de las principales citocinas th1, th2 y th17 en cuyes inoculados de manera experimental con una cepa de *Salmonella* Typhimurium, luego se cuantificaron los niveles de GAPDH, IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-17, TNF- α , IFN- γ y TGF- β , detectándose en todos los individuos pero con una alta variabilidad entre ellos. Esto debido a que son individuos distintos a pesar que las condiciones de crianza (factores ambientales) y manejo fueron iguales para todos los animales.

Los resultados para GAPDH evidenciaron un aumento a partir del día tres post-inoculación. La expresión del gen GAPDH fue detectada en todos los tiempos post-inoculación porque es un gen de mantenimiento y es utilizado como gen endógeno en el PCR realizado. Esto demuestra que no hubo efecto citotóxico sobre los leucocitos, que la integridad y viabilidad de estos son útiles para el análisis de expresión de otros genes de citoquinas utilizadas en el estudio (Schmittgen y Livak, 2008).

Se muestra una expresión de **TNF- α** en el primer día promedio de 40.2 veces más que el calibrador (cuy no inoculado o día "0"), ésta expresión se va reduciendo con el paso de los días hasta el día 5 (3.05 veces más que el calibrador). Se observa un incremento de la expresión el día 7 (57.47), el día 9 disminuye hasta 2.16 veces. Posteriormente los días 15 y 30 post-inoculación aumentaron en promedio de 66.82 y 28.06 veces más que el calibrador respectivamente. Existe una alta variabilidad entre los grupos trabajados (A, B y C), mientras que el grupo inoculado con la bacteria muerta (D) se observó aumento de la expresión los días 9 y 30 post-inoculación (ver

figura 7). En este caso podemos concluir que las expresiones de ésta citocina fue incrementado sus valores con el transcurso de los días. El TNF- α es una citocina proinflamatoria que desempeña un papel importante en los mecanismos de defensa del huésped contra los patógenos intracelulares. Se han descrito varios componentes bacterianos que pueden afectar los niveles de expresión de TNF- α (Vowels *et al.*, 1995). Estos componentes generalmente se secretan o se exponen a la superficie, pero no son necesariamente proteínas. Uno de los inductores conocidos más potentes del TNF- α es el lipopolisacárido (LPS), que es un componente principal de la membrana externa de bacterias gramnegativas como *Salmonella*. Se ha demostrado que las porinas de la membrana externa (OMP) de las bacterias del género *Salmonella* inducen la expresión de TNF- α en monocitos humanos (Galdiero *et al.*, 1993). Ciacci-Woolwine *et al.* (1998) descubrieron un mecanismo por el cual las salmonelas pueden activar la producción de TNF- α . Sus datos demostraron que las especies de *Salmonella* pueden regular al alza de TNF- α en monocitos primarios, así como en células promonocíticas humanas, a través de la liberación de péptidos. Este inductor, que es distinto de LMP y OMP, no está presente o está inactivo en muchas otras especies gramnegativas. Ma *et al.* (2010) plantearon la hipótesis de que *S. Typhimurium* detecta el TNF- α y que el tratamiento con TNF- α modula las proteínas de virulencia de *Salmonella* (proteínas efectoras), cambiando así la interacción huésped-bacteria en las células epiteliales intestinales. En el estudio mencionado, investigaron la expresión de 23 efectores de *Salmonella* después de la exposición a TNF- α . Encontraron que el tratamiento con TNF- α condujo a una expresión efectora diferencial: SipA aumentaba con el tratamiento con TNF- α , mientras que los niveles de expresión de otros efectores, incluyendo spvB, disminuían en presencia de TNF- α . Este estudio demostró una posible interacción de *Salmonella* con el TNF- α liberado por el huésped.

La expresión de **IFN- γ** en el primer día fue en promedio de 3.17 veces más que el calibrador, luego se va reduciendo día a día hasta el día 15 (0.01 veces más que el calibrador). Se observa un incremento en promedio de 13.88 veces el día 30 post-inoculación con la bacteria viva pero con una alta variabilidad

entre los grupos A, B y C; también hubo un incremento de la expresión en el grupo de los inoculados con las bacterias muertas hacia el día 30 pi (Figura 8). Se ha demostrado que el IFN- γ producido por las células T activadas y las células asesinas naturales (NK), desempeñan un papel importante en la defensa del huésped contra patógenos intracelulares como *S. Typhimurium* (Benbernou y Nauciel, 1994), evitando la colonización y en la primera fase de la infección. En modelos murinos, se ha demostrado que existe producción de ARNm de IFN- γ en tejidos linfoides asociados al intestino y en bazo de post-inoculación con *Salmonella* (Ramarathinam *et al.*, 1991). Estudios *in vitro* han demostrado que las células epiteliales y los fibroblastos son resistentes a la invasión de *S. Typhimurium* en presencia de IFN- γ y que este activa los macrófagos peritoneales de ratón, lo que aumenta la destrucción de *S. Typhimurium* (Chen *et al.*, 1989). Experimentos *in vivo* han demostrado que la administración intraperitoneal de IFN- γ puede proteger a los ratones frente a una infección letal de *S. Typhimurium* (Kiderlen *et al.*, 1984). La actividad del IFN- γ está modulada por el hierro y la disponibilidad suficiente de hierro es esencial para el crecimiento de patógenos. Nairz *et al.* (2008) investigaron los efectos reguladores del IFN- γ sobre la homeostasis del hierro y la función inmune en macrófagos murinos post-inoculación con *S. Typhimurium*. Ellos demostraron que IFN- γ ejerció un efecto reductor de los depósitos de hierro intracelular dentro de los fagocitos infectados, restringiendo así la adquisición de hierro por *S. Typhimurium* y promueve la producción de NO y TNF- α .

Se muestra una expresión **IL-2** en el primer día un promedio de 13.38 veces más que el calibrador y que va en aumento hasta el día 30 (20.71 veces), siendo el día 9 el máximo valor promedio (34.36 veces más que el calibrador). En los inoculados con bacterias muestras sólo obtuvimos un incremento el día 15 pi. (Figura 9). Como observamos este incremento de IL-2 es suficiente para linfocitos maduros y su migración hacia el sitio de la inflamación ya que se considera que es uno de los factores de crecimiento más importante de linfocitos T cuando son activados o estimulados por un antígeno, expandiendo su número significativamente (Malek *et al.*, 2002). En ratones deficientes en IL-2 suelen tener mortalidad del 50% entre la cuarta y sexta semana de edad a causa de anemia hemolítica autoinmune, los animales que sobreviven

desarrollan enfermedad inflamatoria intestinal histológicamente similar a las lesiones observadas en colitis ulcerativa en humanos (Meijssen et al., 1998).

IL-12 el primer día muestra una expresión de 75.44 veces más que el calibrador y que va aumentando día a día hasta llegar a un valor de 317.79 veces más que el calibrador (día 30 pi). En el grupo “D” los valores se mantuvieron con expresiones mínimas y fueron constantes los 30 días post-inoculación (Figura 10). IL-12 es producida principalmente por células presentadoras de antígeno, como los fagocitos y las células dendríticas en respuesta a la estimulación microbiana (Trinchieri, 2003). Esta IL-12 se une a su receptor en la membrana del linfocito y activa al factor de transcripción STAT-4, el que a su vez estimula la transcripción de IFN- γ a nivel del núcleo. Es considerado el factor clave para la respuesta inmune Th1 (Germann et al., 1993). Los estudios con ratones con genes inactivados y el fenotipo de pacientes raros con mutaciones en el receptor para la IL-12 apoyan la conclusión de que la IL-12 es importante para la producción de IFN- por los linfocitos NK y los linfocitos T, y para la resistencia del huésped a las bacterias intracelulares y algunos virus (Abbas et al., 2012).

TGF- β muestra una expresión aumentada al día 3 en promedio de 5.28 veces más que el calibrador, luego se reduce el día 5 para aumentar hacia el día 7 hasta 7.59 veces. El día 9 disminuye hasta 0.37 veces. Posteriormente el día 15 hay un incremento en promedio de 11.02 veces, con una alta variabilidad entre los grupos (A, B y C). En el grupo “D” las expresiones están aumentadas los días 9 y 30 post-inoculación (Figura 13). Este incremento se observa en diversos estudios, por ejemplo en ratones ante el estímulo de *Chlamydia trachomatis*, también en monocitos humanos ante el estímulo de *Mycobacterium tuberculosis*, en macrófagos intestinales de ratón antes la presencia de *Mycobacterium avium*, ante protozoos y en infecciones virales como Hepatitis C, Citomegalovirus y VIH (Reed, 1999). El TGF- β es producido por diferentes tipos de células, que incluyen linfocitos B y T y macrófagos activados y es una citoquina multifuncional capaz de una variedad de efectos inmunológicos (Kehrl et al., 1986). El TGF- β juega un papel importante en la progresión de las infecciones de diversas especies bacterianas y parasitarias.

Dado que TGF- β se asocia con la inmunorregulación y el control de las actividades macrófagas. Galdiero *et al.* (1999) investigaron el efecto de la administración *in vivo* de TGF- β en ratones infectados experimentalmente con *S. Typhimurium*. El tratamiento indujo un aumento en la liberación de IFN- γ días después de la infección experimental con *S. Typhimurium*. De acuerdo a los resultados, la expresión de TGF- β resulta crucial para la defensa en una infección por *Salmonella* en ratones. Además como el estudio se realizó en células sanguíneas, el día 30 post-inoculación de los animales, la bacteria se encuentra en grandes cantidades a nivel de tejidos, es por ello que obtenemos las variaciones de los niveles de expresión.

IL-4 muestra una expresión el primer día en promedio de 17.86 veces más que el calibrador, luego se reduce hasta el día el día 9. Posteriormente hay un incremento en promedio de 99.26 veces hacia el día 30 pi. En el “D” las expresiones fueron menores (Figura 11). El aumento de la expresión de IL-4 se asocia a una función de activación y multiplicación de linfocitos B productoras de inmunoglobulinas y de la diferenciación a células del perfil Th2 (células TCD4+) (Paul, 2010).

Se muestra una expresión de **IL-10** en el día 1 de 4.6 veces más que el calibrador y que se va incrementando hasta el día 30 (21.78 veces). No hubo incremento considerado en las expresiones del grupo “D” (Figura 12). En estudios realizados IL-10 aumenta su expresión en presencia de patógenos, controla las respuestas inmunes inflamatorias, promueve la tolerancia inmunológica en mucosas.

Las células Th1 producen IL-2, IFN- γ y TNF- α , mientras que las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Estudios han demostrado el rol crítico que tienen estas citoquinas contra las infecciones por bacterias intracelulares. Inicialmente, la respuesta celular es la encargada de destruir estos patógenos, mediado por la producción de citoquinas por las células Th1. En contraste, las células Th2 tienen un efecto inhibitor de esta respuesta. IL-4 e IL-10 inhiben la activación de macrófagos y favorecen la diferenciación de linfocitos B en

plasmocitos y en la consecuente producción de anticuerpos (Paradise *et al.*, 2006).

Una variedad de citoquinas cooperan en la inmunidad protectora contra *S. Typhimurium* (Eckmann L y Kagnoff, 2001). Se detectó un aumento en la expresión de interleucinas después de la inoculación con *Salmonella*. Sus funciones son diversas y están relacionadas a la eliminación de los agentes microbianos como *Salmonella*. Se ha demostrado que la expresión de IL-2 interviene en la inmunidad innata y está relacionada con la eliminación de *Salmonella* en modelos murinos. Con ello, se resalta la importancia de la inmunidad innata en el control de la proliferación bacteriana temprana (Al-Ramadi *et al.*, 2003).

Finalmente, **IL-17** muestra una expresión el primer día en promedio de 10.05 veces más que el calibrador, que se va reduciendo hasta el día 7 (2.89). Posteriormente el día 9 hay un incremento de 24.42 veces, y hasta el día 30 (38.77 veces más que el calibrador). Hay una variabilidad entre los grupos. En el "D" las expresiones aumentaron el día 9 y 30 post-inoculación (Figura 14). Diversos estudios han demostrado que el IFN- γ e IL-17 aumentan durante el período inicial de la enfermedad por *S. Typhimurium* (Godinez *et al.*, 2008). Es sabido que la respuesta por Th1 es esencial para el control de la infección en roedores y humanos. La respuesta inmune Th1 es bien conocida por ser esencial para el control de la infección por *Salmonella* en ratones y humanos. Rhee *et al.* (2005), demostraron que los ratones con deficiencia de IFN- γ son susceptibles a la infección por *S. Typhimurium*. La otra estrategia de acogida para controlar la colonización y diseminación de los patógenos es limitar su desarrollo mediante la producción de factores antimicrobianos para respaldar el mecanismo de defensa del huésped antes de la inducción de la inmunidad adquirida por Th1. Los macrófagos y las células dendríticas infectadas con *S. Typhimurium* son una fuente de citocinas, incluida IL-12, que estimula las células T en la mucosa intestinal para producir IFN- γ , IL-17A e IL-22 (Godinez *et al.*, 2009).

La interleucina 17 se agregó al estudio por su importancia como citoquina pro-inflamatoria, ésta es producida por células T del receptor de células T CD4⁺ (TCR). Induce la diferenciación y la quimiotaxis de neutrófilos y contribuye a la eliminación de patógenos o induce enfermedades inflamatorias autoinmunes (Infante-Duarte, 2000). IL-17 induce no sólo la migración de neutrófilos sino también la expresión de diversas moléculas antimicrobianas, incluyendo β -defensinas (BD), proteína S100A8/9, un quelante que elimina iones esenciales para la actividad bacteriana y lipocalina-2, un inhibidor de la adquisición de hierro bacteriano (Liang *et al.*, 2006; Godínez *et al.*, 2008). En este estudio, mostramos que IL-17 es producido post-inoculación en cuyes. Es sabido que la IL-17 expresada constitutivamente tiene un papel importante en la protección inicial en la superficie epitelial, posiblemente a través de la inducción de moléculas antimicrobianas (Mayuzumi *et al.*, 2010). IL-17 ejerce múltiples funciones tanto en la inmunidad adquirida como innata. Produce citoquinas proinflamatorias, que induce la diferenciación y la migración de neutrófilos (Matsuzaki y Umemura, 2007; Ouyang *et al.*, 2008).

Es importante agregar el papel que tienen los linfocitos T $\gamma\delta$, su respuesta está dirigida contra agentes como bacterias, virus y parásitos e incluso se ha sugerido que representan el primer paso en la evolución de la inmunidad adaptativa, actúan como eslabón entre las respuestas inmunitarias innata y adquirida. Conforman una población de células T que desempeña diversas actividades como son la regulación de la respuesta inmunitaria, producción de citocinas, actividad citotóxica, presentación de antígeno, reconocimiento de patrones moleculares asociados con patógenos, memoria inmunitaria, entre otras y que interaccionan con otras células inmunitarias como las células dendríticas y los linfocitos NK y NK-T. Se ha demostrado que proporcionan un estímulo temprano esencial de IFN- γ que condiciona a las células dendríticas para una sensibilización eficiente de linfocitos T CD8⁺ y el pleno desarrollo de una respuesta protectora (Bautista, 2010).

Con respecto a la expresión de los animales inoculados con la bacteria inactivada (control), observamos que siempre mantuvieron valores por debajo del promedio de los grupos A, B y C, salvo el día 9 pi en IL-4 y TGF- β con

valores de 21.11 y 5.25 veces el valor del calibrador respectivamente, esto probablemente se debe a que estos dos animales adquirieron una infección distinta ya que en la necropsia e histopatología observamos edema pulmonar sin diagnóstico de salmonelosis, esto se puede asociar a un cuadro respiratorio.

El presente estudio se limitó al análisis de expresión génica de citoquinas, sin embargo también se agrega la histopatología, donde las lesiones encontradas en los órganos de los cuyes fueron similares en todos los días evaluados, resultados que comprueban la infección por Salmonelosis (Layme et al., 2009). El aislamiento e histopatología finalmente se hizo para constatar la infección. También se hizo la lectura en los cuyes del grupo D, donde sólo hubo un animal el día 09 post-inoculación que presentó observaciones en pulmón y los demás aparentemente normales. En el recuento bacteriano de heces se observó lecturas positivas a la presencia o eliminación de *S. Typhimurium* hasta el día 15 post-inoculación (anexo 1). Estos resultados del presente estudio de citoquinas generaron un importante conocimiento acerca de la respuesta inmune involucrada en la infección experimental de *Salmonella* en cuyes, pues el fin es generar y aplicar medidas de prevención para su control.

VI. CONCLUSIONES

- En ensayos *in vivo*, la administración de 10^2 UFC/ml de *Salmonella* Typhimurium vía intraperitoneal en cuyes incrementó la expresión de IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-17, TNF- α , IFN- γ y TGF- β .
- Los primeros tres días predominio de las expresiones Th1. Posteriormente ambas aumentan y a partir del día 9 pi., predominio y con más intensidad de las expresiones de los genes de las citoquinas del perfil Th2.

VII. LITERATURA CITADA

1. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. 2012. Inmunología celular y molecular. Séptima edición. Elsevier.
2. Aliaga L. 1995. Importancia de la crianza de cuyes en el ecosistema andino. En: Crianza de cuyes. Lima: INIA. 45 p.
3. Allen S. S. and McMurray D. N. 2003. Coordinate cytokine gene expression in vivo following induction of tuberculosis pleurisy in guinea pigs. *Infect. Immun.* 71:4271-4277.
4. Al-Ramadi BK, Mustafa N, AbouHaidar M, Fernandez-Cabezudo MJ. 2003. Induction of innate immunity by IL-2-expressing *Salmonella* confers protection against lethal infection. *Molecular Immunology*; Mar 1;39(13):763–70.
5. Ameghino C. 1968. Sobre un brote de salmonelosis en cuyes (*Cavia cobaya*). *Extr IVITA* (3): 260-261.
6. Baumler AJ, Tsolis RM, Ficht TA, Adams LG. 1998. Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect Immun*; 66(10):4579–4587.
7. Bautista Garfas C. R. 2010. Importance of $\gamma\delta$ T lymphocytes in the bovine immune response. *Vet. Méx* vol.42 no.1 México ene./mar. 2011.
8. Barr T, Brown S, Mastroeni P, Gray D. 2010. TLR and B cell receptor signals to B cells differentially program primary and memory Th1 responses to *Salmonella enterica*. *J Immunol.* 185(5): 2783–2789.
9. Behnsen J, Perez-Lopez A, Nuccio S-P, Raffatellu M. 2015. Exploiting host immunity: the *Salmonella* paradigm. *Trends in Immunology.* 36(2): 112–20.
10. Benbernou N, Nauciel C. 1994. Influence of mouse genotype and bacterial virulence in the generation of interferon-gamma-producing cells during the early phase of *Salmonella typhimurium* infection. *Immunology* ;83:245
11. Brock T. 1999. Robert Koch: a life in medicine and bacteriology. American Society for Microbiology. Washington DC.
12. Brooks J. 1996. The sad and tragic life of Typhoid Mary. *CMAJ.* 154: 915-916.
13. Broughton SE., Dhagat U., Hercus TR., Nero TL., Grimbaldeston MA., Bonder CS., Lopez AF., Parker MW. La familia de receptores de citoquinas GM-CSF/IL-3/IL-5: desde el reconocimiento del ligando hasta el inicio de la señalización. *Inmunol Rev.* 2012.
14. Broz P, Ohlson M, Monack D. 2012. Innate immune response to *Salmonella typhimurium*, a model enteric pathogen. *Gut Microbes.* 3(2): 62-70.
15. Bunte K. 1996. Analyses of the temporal variation of coarse bedload transport and its grain size distribution (Squaw Creek, Montana, USA). U.S.D.A., Forest Service, Rocky Mountain Forest and Range Experiment Station, General Technical Report RM-GTR-288, 124 p.
16. Bustamante J. 1993. Producción de cuyes. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 1ra edición. Lima.

17. Caffer M, Terragno R, Binsztein N. 2008. Manual de procedimientos: Diagnóstico y caracterización de *Salmonella* spp. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. "Carlos Malbrán", Buenos Aires, Argentina. Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv para América del Sur.
18. Cano J. 2012. Efecto de la suplementación de probiótico líquido sobre los parámetros productivos en cuyes (*Cavia porcellus*) durante la fase de crecimiento y engorde. Tesis para obtener el Título de Médico Veterinario. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú.
19. Chauca L. 1997. Producción de cuyes (*Cavia porcellus*). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Roma.
20. Chauca L. 2016. Perú ha realizado las mayores investigaciones sobre cuyes en países andinos. Entrevista por León J. Recuperado de <http://agraria.pe/noticias/peru-ha-realizado-las-mayores-investigaciones-10838>
21. Chen Y, Nakane A, Minagawa T. 1989. Recombinant murine gamma interferon induces enhanced resistance to *Listeria monocytogenes* infection in neonatal mice. *Infect Immun*;57:2345.
22. Ciacci-Woolwine F, Blomfield IC, Richardson SH, Mizel SB. 1998. *Salmonella* Flagellin Induces Tumor Necrosis Factor Alpha in a Human Promonocytic Cell Line. *Infection and Immunity* ;66(3):1127-1134.
23. Conlan J. 1996. Neutrophils prevent extracellular colonization of the liver microvasculature by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun*. 64(3): 1043–1047.
24. Dorman C. 2009. Global regulators and environmental adaptation in Gram-negative pathogens. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(1): 47–50.
25. Durandy A, Taubenheim N, Peron S, Fischer A. 2007. Pathophysiology of B-cell intrinsic immunoglobulin class switch recombination deficiencies. *Adv Immunol*. 94:275–306.
26. Eckmann L, Kagnoff MF. Cytokines in host defense against *Salmonella*. *Microbes Infect*. 2001;3:1191–200
27. Evans A. 2005. Import risk analysis: Domestic guinea pig, *Cavia porcellus*, imported from Australia. Draft Report. Disponible en: http://hintlink.com/guinea_pig/Nzriskanalysis.pdf
28. Fabrefa A, Vila J. 2013. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clin Microbiol Rev*. 26: 308 –341.
29. Figueroa I., Verdugo A. 2005. Mecanismos Moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 47(1-2): 25-42
30. Flores R. 1981. Epizootiología de la Salmonelosis en Bovinos, porcinos y aves. *Ciencia Veterinaria* 3: 147-175.
31. Gabrielli S, Ortolani C, Del Zotto G, Luchetti F, Canonico B, Bucella F, Artico M, Papa S, Zamai L. 2016. The Memories of NK Cells: Innate-Adaptive Immune Intrinsic Crosstalk. *Journal of Immunology Research*. Vol 2016, Article ID1376595, 14p.

32. Galdiero F, Cipollaro de L'Ero G, Benedetto N, Galdiero M, Tufano M A. 1993. Release of cytokines induced by *Salmonella typhimurium* porins. *Infect Immun*;61:155–161.
33. Galdiero M, Marcatili A, Cipollaro de l'ero G, et al. 1999. Effect of Transforming Growth Factor β on Experimental *Salmonella typhimurium* Infection in Mice. Moore RN, ed. *Infection and Immunity*;67(3):1432-1438.
34. Gálvez-Gastélum FJ, Sandoval-Rodríguez AS, Armendáriz-Borunda J. 2004. El factor de crecimiento transformante beta como blanco terapéutico. *Salud pública. México* 46(4): 341-350.
35. Ganaway JR. 1976. The biology of the guinea pig. Academic Press, New York.
36. Garmendia M., Selgrad S., Alezones F. 2000. Salmonelosis en animales de laboratorio. FONAIAP.
37. Gart E, Suchodolski J, Welsh T, Alaniz R, Randel R, Lawhon S. 2016. *Salmonella Typhimurium* and Multidirectional Communication in the Gut. *Frontiers in Microbiology*.
38. Germann, T., M. K. Gately, D. S. Schoenhaut, M. Lohoff, F. Mattner, S. Fischer, S. C. Jin, E. Schmitt, and E. Rude. 1993. Interleukin-12/T cell stimulating factor, a cytokine with multiple effects on T helper type 1 (Th1) but not on Th2 cells. *Eur. J. Immunol.* **23**:1762-1770.
39. Giannella R. 1996. *Salmonella*. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology* . 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston.
40. Gil V. 2007. Importancia del cuy y su competitividad en el mercado. En: XX Reunion ALPA. Cusco: Asociacion Latinoamericana de Produccion Animal.
41. Godinez I, Haneda T, Raffatellu M, et al. 2008. T cells help to amplify inflammatory responses induced by *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in the intestinal mucosa. *Infect Immun* ;76:2008–17.
42. Godinez I, Raffatellu M, Chu H et al. 2009. Interleukin-23 orchestrates mucosal responses to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in the intestine. *Infect Immun*; 77: 387–98.
43. Grimont P, Weill F. 2007. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. 9th ed. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* – Instituto Pasteur, París. Francia.
44. Guibourdenche M, Roggentin P, Mikoletit M, Fields P, Bockemuhl J, Grimont P, Weill F. 2010. Supplement 2003-2007 (No.47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res. Microbiol.* 161: 26-29.
45. Gutiérrez Pabello J. A. 2010. *Inmunología Veterinaria*. Editorial El Manual Moderno.
46. Gyles C. Prescott J. Songer G, Thoen C. 2010. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Fourth Edition. Blackwell Publishing.
47. Hallstrom K, McCormick B. 2011. *Salmonella* interaction with and passage through the intestinal mucosa: through the lens of the organism. *Front. Microbiol.* 2 (88).
48. Hamerman JA, Ogasawara K, Lainer LL. 2005. *Curr Opin Immunol* 17(1):29-35.
49. Han H, Sreelatha A, Orth K. 2011. Manipulation of host membranes by bacterial effectors. *Nature Reviews Microbiology*. 18(9).

50. Hoiseth S, Stocker B. 1981. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are nonvirulent and effective as live vaccines. *Nature*. 291(5812): 238–239.
51. [INEI] Instituto Nacional de Estadística e Informática. 2012. IV Censo nacional agropecuario 2012-sistema de consulta de cuadros estadísticos. Perú: INEI [Internet], [Agosto 2014]. Disponible en: <http://censos.inei.gob.pe/cenagro/tabulados/>
52. Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T. 2000. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol*; 165:6107–15.
53. Jamshidi A, Kalidari G, Hedayati M. 2010. Isolation and identification of *Salmonella Enteritidis* and *Salmonella Typhimurium* from the eggs of retail stores in mashhad, iran using conventional culture method and multiplex PCR assay. *Journal of Food Safety*. 30: 558–568.
54. Kaiser P, Hardt W. 2011. *Salmonella typhimurium* diarrhea: switching the mucosal epithelium from homeostasis to defense. *Curr Opin Immunol*. 23(4): 456–463.
55. Keating J. 1892. The etiology of typhoid fever. *Physician Surg*. 14:469–472
56. Kehrl J H, Roberts A B, Wakefield L M, Jakowlew S, Sporn M B, Fauci A S. 1986. Transforming growth factor- β is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *J Immunol*;137:3855–3860.
57. Kiderlen AF, Kaufmann SH, Lohmann-matthes ML. 1984. Protection of mice against the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* by recombinant immune interferon. *Eur J Immunol*;14:964.
58. Kingsley RA, van Amsterdam K, Kramer N, Bäumlér AJ. 2000. The *shdA* gene is restricted to serotypes of *Salmonella enterica* subspecies I and contributes to efficient and prolonged fecal shedding. *Infect Immun*.;68(5):2720–2727.
59. Kirby A, Sundquist M, Wick M. 2004. In vivo compartmentalization of functionally distinct, rapidly responsive antigen-specific T-cell populations in DNA-immunized or *Salmonella enterica* serovar Typhimurium-infected mice. *Infect Immun*. 72(11): 6390–6400
60. Kupz A, Scott T, Belz G, Andrews D, Greyer M, Lew A, Brooks A, Smyth M, Curtiss R, Bedoui S, Strugnell R. 2013. Contribution of Thy1+ NK cells to protective IFN-gamma production during *Salmonella typhimurium* infections. *Proc Natl Acad Sci* . 110(6): 2252–2257.
61. Layme A. 2009. Frecuencia de lesiones anatomopatológicas en cobayos con diagnostico bacteriológico de *Salmonella* sp. Remitidos al laboratorio de histología, embriología y patología veterinaria de la FMV-UNMSM durante el periodo 2001-2007. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ Nacional Mayor de San Marcos. 66 p.
62. Lee S, McLachlan J, Kurtz J, Fan D, Winter S, Baumler A, Jenkins M, McSorley S. 2012. Temporal expression of bacterial proteins instructs host CD4 T cell expansion and Th17 development. *PLoS Pathog*. 8(1): 1-14.

63. Liang SC., Tan XY., Luxenberg DP., Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 2006; 203:2271–9.
64. Liebermeister K. 1896. Cholera Asiatica und Cholera Nostras. Alfred Hölder, Vienna. 132.
65. Livak KJ., Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. 2001 Dec;25(4):402-8.
66. Ma, J., Zhang, Y., Xia, Y., & Sun, J. 2010. The inflammatory cytokine tumor necrosis factor modulates the expression of *Salmonella* typhimurium effector proteins. *Journal of Inflammation (London, England)*, 7, 42.
67. MacDonald T, Monteleone G. 2005. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* 307: 1920–1925.
68. Majdalani, N, Gottesman S. 2005. The Rcs phosphorelay: A complex signal transduction system. *Annual Review of Microbiology*, 59, 379–405.
69. Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, Jones TF, Fazil A, Hoekstra RM. 2010. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis*; 50(6):882–889.
70. Malek TR, Yu A, Vincek V, Scibelli P, Kong L. 2002. CD4 Regulatory T Cells Prevent Lethal Autoimmunity in IL-2R Deficient Mice: Implications for the Nonredundant Function of IL-2. *Autoimmunity*.17:167-178.
71. Malik-Kale P, Jolly C, Lathrop S, Winfree S, Luterbach C, Steele-Mortimer O. 2011. *Salmonella* – at home in the host cell. *Front. Microbiol.* 2: 125.
72. Matsuura S. A. Susceptibilidad a antibacterianos in vitro de *Salmonella* entérica aislada de cobayos de crianza familiar-comercial en la provincia de Carhuaz, Ancash. 2008.
73. Matsuzaki G, Umemura M. 2007. Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiol Immunol* ;51:1139–47.
74. Maynard CL, Hatton RD, Helms WS, Oliver JR, Stephensen CB, Weaver CT. 2009. Contrasting roles for all-trans retinoic acid in TGF-beta-mediated induction of Foxp3 and Il10 genes in developing regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine*, 206(2):343-357.
75. Mayuzumi, H., Inagaki-Ohara, K., Uyttenhove, C., Okamoto, Y., & Matsuzaki, G. 2010. Interleukin-17A is required to suppress invasion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to enteric mucosa. *Immunology*, 131(3), 377–385.
76. McSorley S, Asch S, Costalonga M, Reinhardt R, Jenkins M. 2002. Tracking *Salmonella*-specific CD4 T cells in vivo reveals a local mucosal response to a disseminated infection. *Immunity*. 16(3): 365–377.
77. McSorley S, Ehst B, Yu Y, Gewirtz A. 2002. Bacterial flagellin is an effective adjuvant for CD4+ T cells in vivo. *J Immunol*. 169(7): 3914–3919.

78. Meijssen MAC, Brandwein SL, Reinecker HC, Bhan AK, Podolsky DK. 1998. Alteration of gene expression by intestinal epithelial cells precedes colitis in interleukin-2-deficient mice splice forms Alteration of gene expression by intestinal epithelial cells precedes colitis in interleukin-2-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 274:472-479.
79. Mitchell E, Mastroeni P, Kelly A, Trowsdale J. 2004. Inhibition of cell surface MHC class II expression by Salmonella. *Eur J Immunol.* 34(9): 2559–2567.
80. Mittrucker H, Kohler A, Kaufmann S. 2002. Characterization of the murine T-lymphocyte response to Salmonella enterica serovar Typhimurium infection. *Infect Immun.* 70(1): 199–203.
81. Moorhead R. 2002. William Budd and typhoid fever. *J R Soc Med.* 95: 561-564.
82. Muller A, Kaiser P, Dittmar K, Weber T, Haueter S, Endt K, Songhet P, Zellweger C, Kremer M, Fehling H, Hardt W. 2012. Salmonella gut invasion involves TTSS-2-dependent epithelial traversal, basolateral exit, and uptake by epithelium-sampling lamina propria phagocytes. *Cell Host Microbe.* 11(1):19–32.
83. Nairz M, Fritsche G, Brunner P, Talasz H, Hantke K, Weiss G. 2008. Interferon-gamma limits the availability of iron for intramacrophage Salmonella typhimurium. *Eur J Immunol*; Jul;38(7):1923–36.
84. Nanton M, Way S, Shlomchik M, McSorley S. 2012. Cutting edge: B cells are essential for protective immunity against Salmonella independent of antibody secretion. *J Immunol.* 189(12): 5503–5507.
85. Nelson R, McLachlan J, Kurtz J, Jenkins M. 2013. CD4+ T cell persistence and function after infection are maintained by low-level peptide: MHC class II presentation. *J Immunol.* 190(6): 2828–2834.
86. Oldenkamp E. 2004. Predecessors: veterinarians from earlier times, Daniel Elmer Salmon (1850-1914). *Tijdschr Diergeneeskde.* 129: 554-555
87. Olsen JE, Skov M. 1994. Genomic lineage of *Salmonella enterica* serovar Dublin. *Vet Microbiol*; 40(3-4):271–282.
88. Opal SM, Depalo VA. 2000. Anti – inflammatory cytokines. *Chest*, 117: 1162-1172.
89. Ordoñez Noriega R. Plan de Introducción de la carne de cuy en Lima Metropolitana: Estudio de mercado y propuesta empresarial. Pontificia Universidad Católica del Perú. 2003.
90. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. 2008. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*; 28:454–67.
91. Panda A.; Tatarov I., Masek B.J., Hardick J., Crusan A., Wakefield T., Carroll K, Yang S, Hsieh Y. H., Lipsky M, McLeod C, Levine M, Rothman R, Gaydos C, DeTolla L. 2014. A rabbit model of non-typhoidal *Salmonella* bacteremia. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 37 (4): 211-220.
92. Paradise LJ, Friedman H, Bendinelli M. 2006. Opportunistic Intracellular Bacteria and Immunity. Springer Science & Business Media; 322 p.
93. Parra M, Durango J, Mattar S. 2002. Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por Salmonella. *MVZ Córdoba.* 7 (2): 235-340.

94. Paul WE. 2010. What determines Th2 differentiation, in vitro and in vivo? *Immunology and cell biology*, 88(3): 236-239.
95. Raffatellu M, Chessa D, Wilson R, Tukel C, Akcelic M, Baumler A. 2006. Capsule-mediated immune invasion: A new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis. *Infect Immun* 74:19-27.
96. Ramarathinam L, Shaban RA, Niesel DW, Klimpel GR. 1991. Interferon gamma (IFN-gamma) production by gut-associated lymphoid tissue and spleen following oral *Salmonella typhimurium* challenge. *Microb Pathog*; 11:347.
97. Ramirez I. 1972. Estudio bacteriológico y epidemiológico de un brote infeccioso en cobayos (*Cavia porcellus*). Tesis de Médico Veterinario UNMSM, Lima.
98. Reed SG. 1999. TGF- β in infections and infectious diseases. *Microbes and Infection*, 1(15), 1313-1325.
99. Rhee SJ, Walker WA, Cherayil BJ. 2005. Developmentally regulated intestinal expression of IFN- γ and its target genes and the age-specific response to enteric *Salmonella* infection. *J Immunol*. 175:1127–36.
100. Robinson G. 1970. Gaffky, Gerog Theodor August. *Dictionary of Scientific Biographies*, ed Gillispie C. Scribners. New York.
101. Ryan D, Pati N, Ojha U, Padhi C, Ray S, Jaiswal S, Singh G, Mannala G, Schultze T, Chakraborty T, Suar M. 2015. The Acid Tolerance Response of *Salmonella Typhimurium*: Global Transcriptome and 2 Mutagenic Analysis. *Appl. Environ. Microbiol*.
102. Rydstrom A, Wick M. 2007. Monocyte recruitment, activation, and function in the gut-associated lymphoid tissue during oral *Salmonella* infection. *J Immunol*. 178(9): 5789–5801.
103. Salazar-Gonzalez RM, Niess JH, Zammit DJ, Ravindran R, Srinivasan A, Maxwell JR, Stoklasek T, Yadav R, Williams IR, Gu X, McCormick BA, Pazos MA, Vella AT, Lefrancois L, Reinecker HC, McSorley SJ. 2006. CCR6-mediated dendritic cell activation of pathogen-specific T cells in Peyer's patches. *Immunity* 24(5):623-32.
104. Salazar GR, Srinivasan A, Griffin A, Muralimohan G, Ertelt J, Ravindran R, Vella A, McSorley S. 2007. *Salmonella* flagellin induces bystander activation of splenic dendritic cells and hinders bacterial replication in vivo. *J Immunol*. 179(9): 6169–6175.
105. Salcedo S, Noursadeghi M, Cohen J, Holden D. 2001. Intracellular replication of *Salmonella Typhimurium* strains in specific subsets of splenic macrophages in vivo. *Cell Microbiol*. 3: 587–597.
106. Santos R, Raffatellu M, Bevins C, Adams L, Tükel C, Tsois R, Bäumlér A. 2009. Life in the inflamed intestine, *Salmonella* style. *Trends Microbiol*. 17(11): 498–506.
107. Scarozza A. M. Ramsingh A. I. Wicher V. Wicher K. 1998. Spontaneous cytokine gene expression in normal guinea pig blood and tissues.
108. Schmittgen T, Livak K. 2008. Analyzing real-time PCR data by comparative Ct method. *Nature Protocols*. 3(6): 1101-1108.
109. Schulz S, Kohler G, Holscher C, Iwakura Y, Alber G. 2008. IL-17A is produced by Th17, gammadelta T cells and other CD4+ lymphocytes during infection with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and has a mild effect in bacterial clearance. *Int Immunol*. 20(9): 1129–1138.

110. Sierro F, Dubois B, Coste A, Kaiserlian D, Kraehenbuhl J, Sirard J. 2001. Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci.* 98(24): 13722–13727.
111. Smith HW, Jones JE. 1967. Observations on experimental oral infection with *Salmonella* dublin in calves and *Salmonella* choleraesuis in pigs. *J Pathol Bacteriol*; 93(1):141–156. doi: 10.1002/path.1700930114.
112. Soper G. 1939. The curious career of Typhoid Mary. *Bull N Y Acad Med.* 15: 698-712.
113. Soumet C, Ermel G, Rose V, Rose N, Drouin P, Salvat G, Collin P. 1999. Identification by a multiplex PCR-based assay of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis strains from environmental swabs poultry houses. *Lett App Microbiol.* 29(1): 1-6.
114. Spees A, Kingsbury D, Wangdi T, Xavier M, Tsois R, Baumler A. 2014. Neutrophils are a source of gamma interferon during acute *Salmonella* enterica serovar Typhimurium colitis. *Infect Immun.* 82(4):1692–1697.
115. Srinivasan A, Foley J, McSorley S. 2004. Massive number of antigen-specific CD4 T cells during vaccination with live attenuated *Salmonella* causes interclonal competition. *J Immunol.* 172(11): 6884–6893.
116. Stock A, Robinson V, Goudreau P. 2000. Two-component signal transduction. *Annual Review of Biochemistry.* 69: 183–215.
117. Tangye SG, Tarlinton DM. 2009. Memory B cells: effectors of long-lived immune responses. *Eur J Immunol.* 39:2065–2075.
118. Tizard I. R. 2009. *Inmunología veterinaria*. 8° ed. Barcelona: Elsevier.
119. Trinchieri, G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3:133-146.
120. Ugrinovic S, Menager N, Goh N, Mastroeni P. 2003. Characterization and development of T-cell immune responses in B-cell-deficient (Igh-6(-/-)) mice with *Salmonella* enterica serovar Typhimurium infection. *Infect Immun.* 71(12): 6808–6819.
121. Vargas-Galindo Á. 2007. Probabilistic inversion in priority setting of food borne pathogens. MSc thesis, Delft University of Technology, Department of Applied Mathematics and Risk Analysis.
122. Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Baumler A, Falkow S, Valdivia R, Brown W, Le M, Berggren R, Tony W, Fang F. 1999. Nature. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. 401: 804–808.
123. Vivier E, Raulet D, Moretta A, Caligiuri, Zitvogel, Lainer L, Yokohama W, ugolini S. 2011. Innate or Adaptative Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science* 7;331(3013): 44-49.
124. Voedisch S., Koenecke C, David S, Herbrand H, Förster R, Rhen M, Pabst O. 2009. Mesenteric lymph nodes confine dendritic cell-mediated dissemination of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium and limit systemic disease in mice. *Infect Immun.* 77(8): 3170–3180.
125. Vowels B R, Yang S, Leyden J J. 1995. Induction of proinflammatory cytokines by a soluble factor of *Propionibacterium acnes*: implications for chronic inflammatory acne. *Infect Immun*; 63:3158–3165.
126. Yamada H., Udagawa T., Mizuno S., Sugawara I. Newly Designed Primer Sets Available for Evaluating Various Cytokines and iNOS mRNA Expression in Guinea Pig Lung Tissues by RT-PCR. 2005.

127. Yrlid U, Svensson M, Hakansson A, Chambers B, Ljunggren H, Wick M. 2001. In vivo activation of dendritic cells and T cells during *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun.* 69(9): 5726–5735.
128. Uzzau S, Brown DJ, Wallis T, Rubino S, Leori G, Bernard S, Casadesus J, Platt DJ, Olsen JE. 2000. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiol Infect.* 125(2):229–255., doi:10.1017/S0950268899004379.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Recuento de *Salmonella* en heces (agar XLD) días post-infección.

ID	UFC/g
A ₁	1x10 ⁵
B ₁	5x10 ⁵
C ₁	5x10 ⁵
D ₁	0
A ₃	0
B ₃	0
C ₃	0
D ₃	0
A ₅	6x10 ⁶
B ₅	2.15x10 ⁷
C ₅	0
D ₅	0
A ₇	0
B ₇	3x10 ⁵
C ₇	6.6x10 ⁶
D ₇	0
A ₉	0
B ₉	4.5x10 ⁶
C ₉	5.85x10 ⁷
D ₉	0
A ₁₅	0
B ₁₅	0
C ₁₅	2.3x10 ⁶
D ₁₅	0
A ₃₀	0
B ₃₀	0
C ₃₀	0
D ₃₀	0

Anexo 2: Aislamiento de tejidos en Agar XLD

- ✓ El aislamiento se realizó para confirmar junto a la histopatología el desarrollo de la enfermedad y la colonización de la bacteria en los tejidos. Las lecturas fueron positivas a *Salmonella* en todos los días post-inoculación.

Fig.1 Día 3 post-inoculación

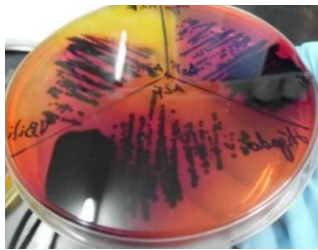


Fig.2 Día 5 post-inoculación

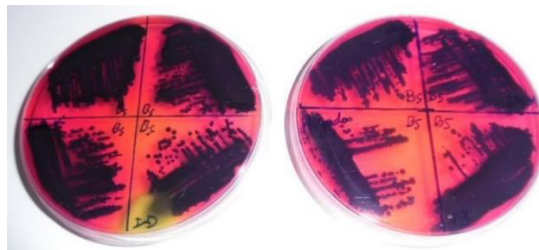


Fig. 3 Día 7 post-inoculación

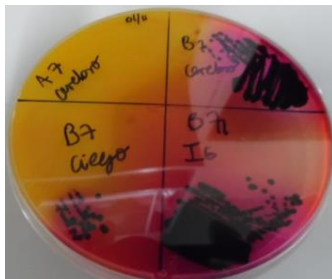


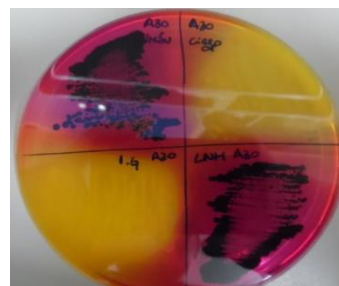
Fig. 4 Día 9 post-inoculación



Fig. 5 Día 15 post-inoculación



Fig. 6 Día 30 post- inoculación



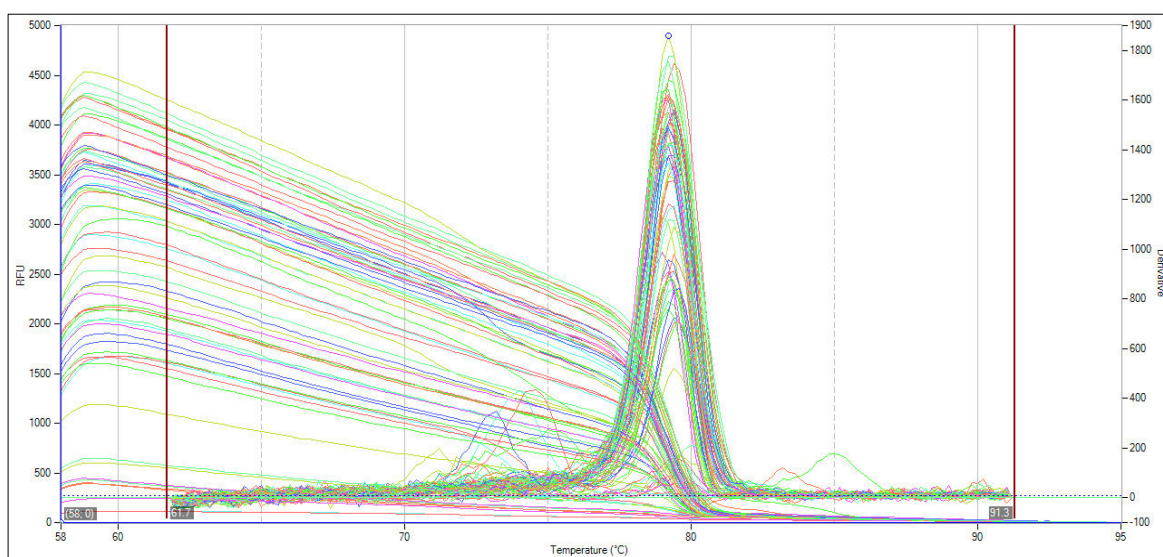
Anexo 3: Resultados de la PCR en tiempo real.

1. **Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH):** se evaluaron los perfiles de GAPDH mediante qPCR, mostrando los siguientes resultados:

Cuadro 1. Perfiles de GADPH según días post-inoculación y poza de procedencia.

GRUPO DIAS	A	B	C	D
0	25.80	29.49	25.30	26.86
1	30.12	30.96	33.19	25.78
3	30.95	31.29	27.02	33.11
5	29.02	29.76	26.51	25.91
7	33.54	30.00	31.40	31.65
9	33.50	23.43	23.43	32.36
15	31.66	30.05	32.98	30.05
30	31.95	32.85	29.18	27.97

Figura 1. Resultados de qPCR para GADPH.

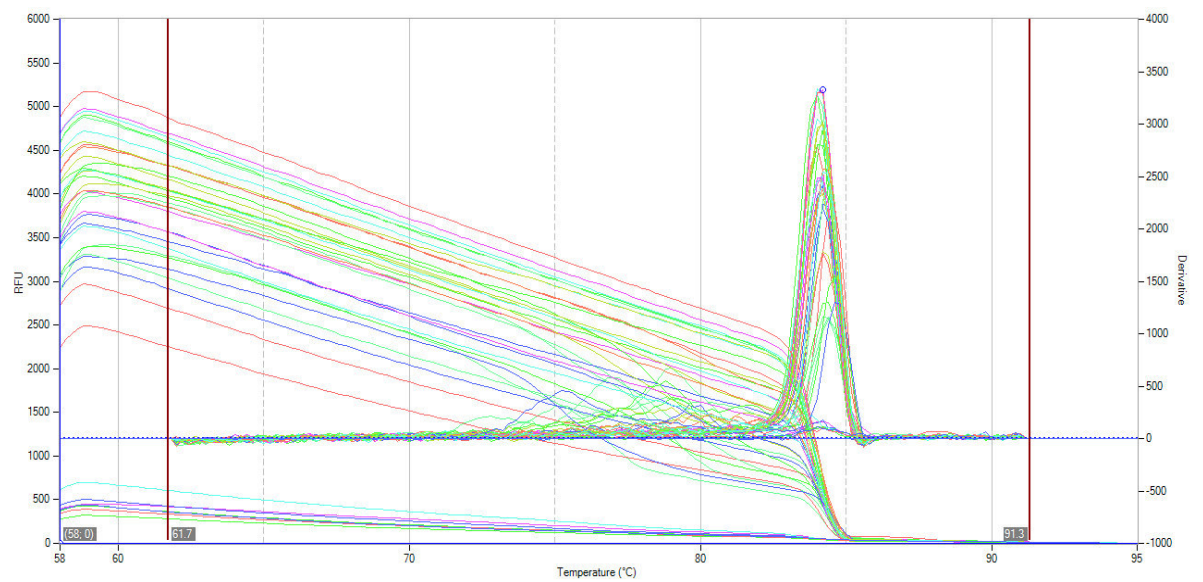
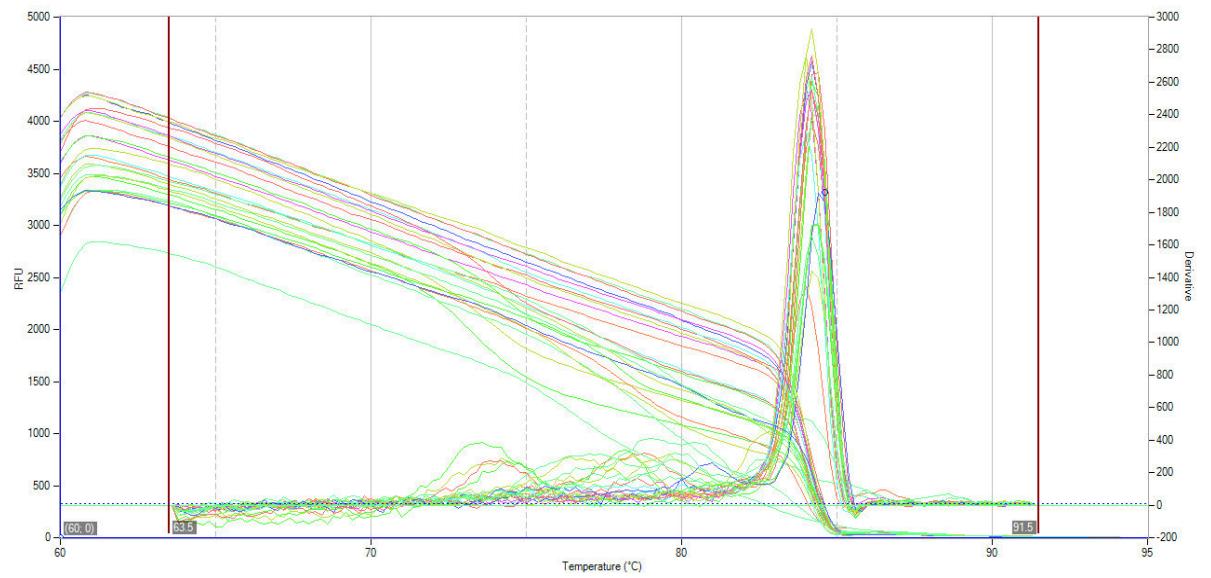


2. Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α): se evaluaron los perfiles de TNF- α mediante qPCR, mostrando los siguientes resultados:

Cuadro 2. Perfiles de TNF- α según días post-inoculación y poza de procedencia.

GRUPO DIAS	A	B	C	D
0	25.80	29.49	25.30	26.86
1	30.12	30.96	33.19	25.78
3	30.95	31.29	27.02	33.11
5	29.02	29.76	26.51	25.91
7	33.54	30.00	31.40	31.65
9	33.50	23.43	23.43	32.36
15	31.66	30.05	32.98	30.05
30	31.95	32.85	29.18	27.97

Figura 2. Resultados de qPCR para TNF- α

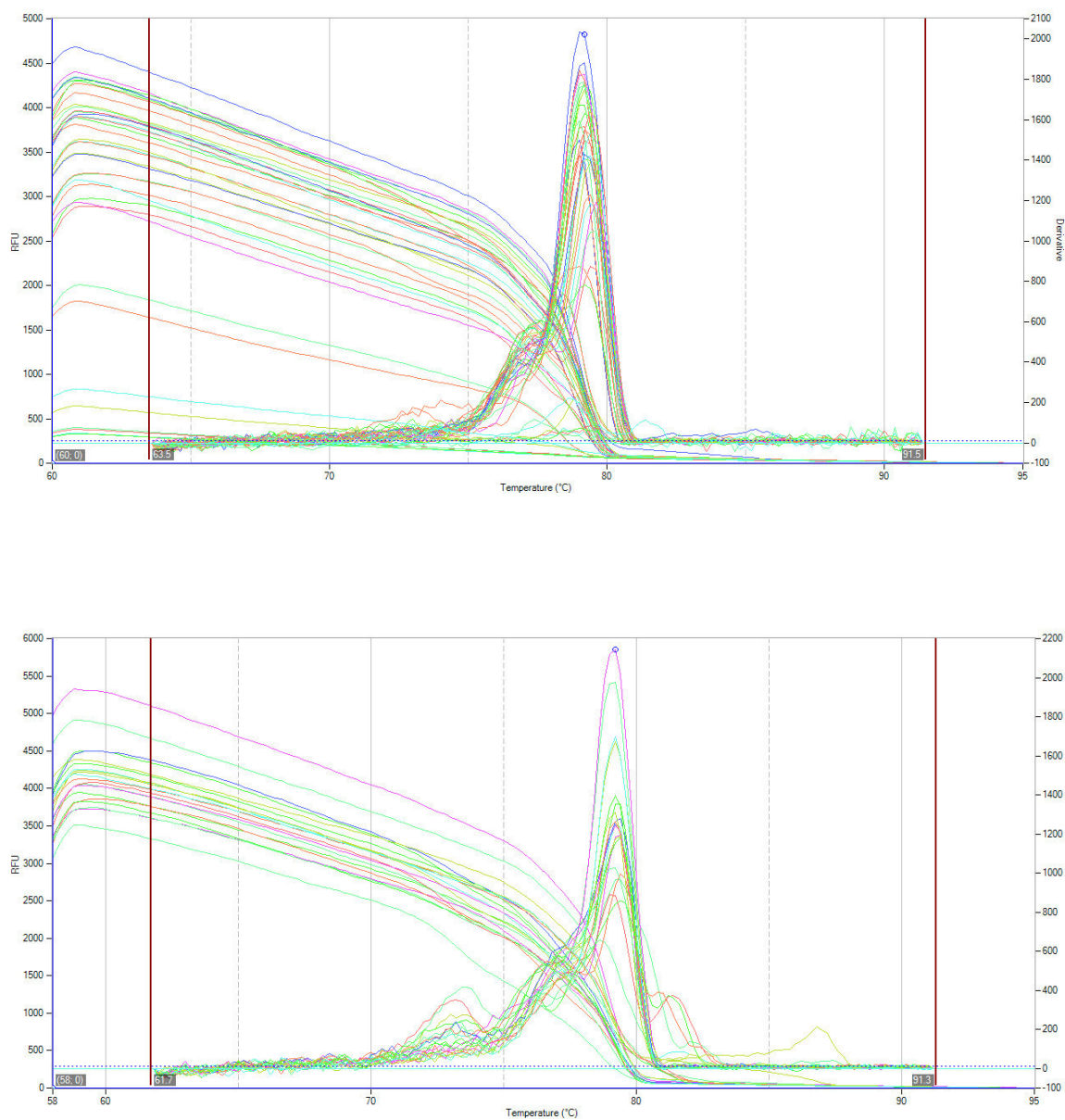


- 3. Interferón Gamma (IFN- γ):** se evaluaron los perfiles de IFN- γ mediante qPCR, mostrando los siguientes resultados:

Cuadro 3. Perfiles de IFN- γ según días post-inoculación y poza de procedencia.

GRUPO- DIAS	A	B	C	D
0	26.71	32.33	26.11	28.38
1	33.27	31.20	32.30	25.82
3	31.27	40.00	27.75	35.86
5	40.00	30.15	28.91	29.67
7	40.00	40.00	40.00	40.00
9	40.00	40.00	40.00	40.00
15	40.00	40.00	40.00	40.00
30	29.09	30.88	40.00	26.57

Figura 3. Resultados de qPCR para IFN- γ .

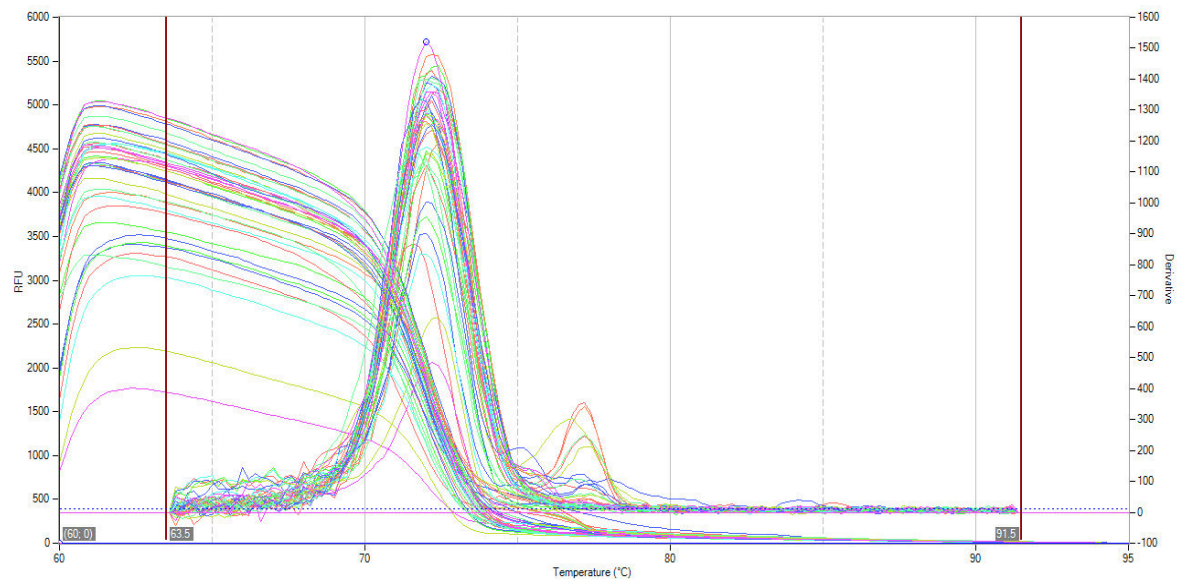
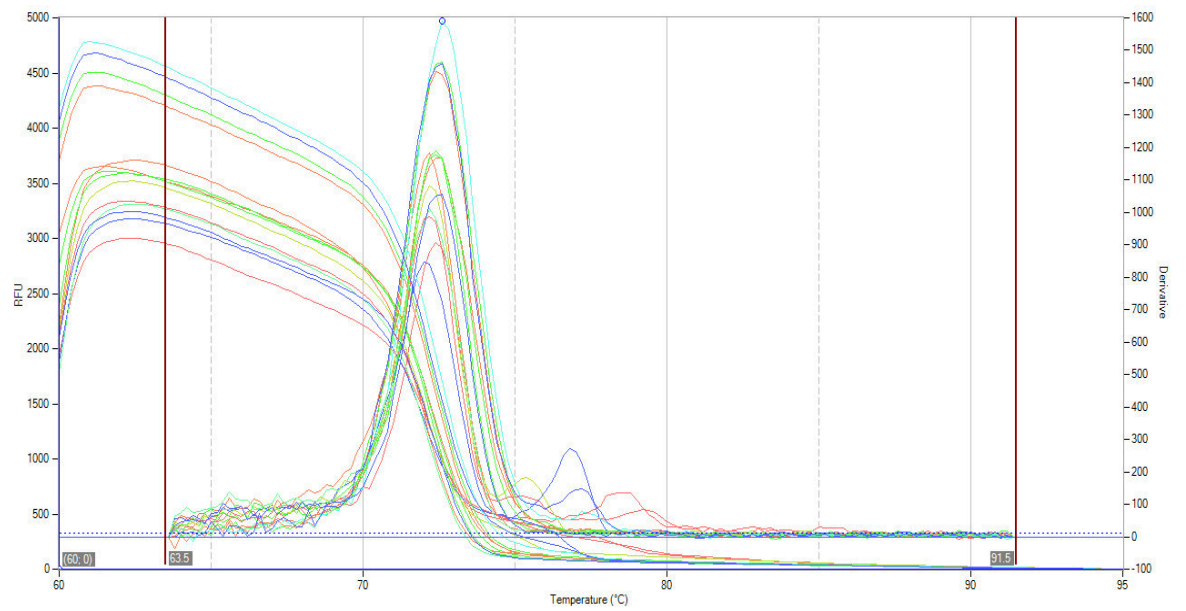


- 4. Interleucina 2 (IL-2):** se evaluaron los perfiles de IL-2-γ mediante qPCR, mostrando los siguientes resultados:

Cuadro 4. Perfiles de IL-2-γ según días post-inoculación y poza de procedencia.

GRUPO DIAS	A	B	C	D
0	23.90	32.42	27.70	28.52
1	25.81	31.45	30.73	29.48
3	24.06	31.13	23.79	33.57
5	32.44	27.04	24.85	36.35
7	31.31	27.63	28.63	40.00
9	25.16	22.31	32.46	36.00
15	29.11	28.86	32.72	28.28
30	27.96	30.53	27.27	34.51

Figura 4. Resultados de qPCR para IL-2-γ.

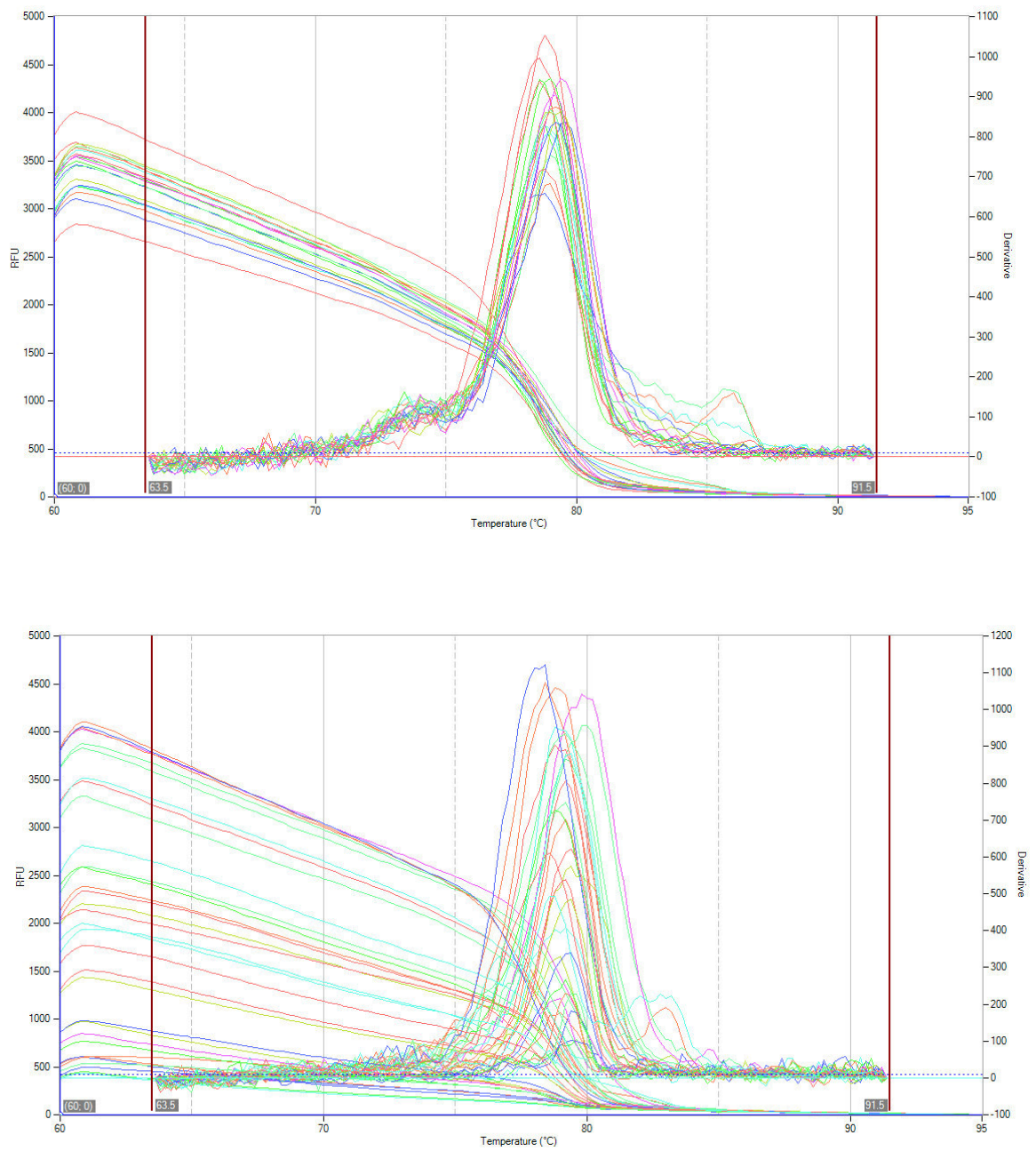


5. Interleucina 12 (IL-12): se evaluaron los perfiles de IL-12 mediante qPCR, mostrando los siguientes resultados:

Cuadro 5. Perfiles de IL-12 según días post-inoculación y poza de procedencia.

GRUPO DIAS	A	B	C	D
0	29.02	29.33	26.48	28.28
1	25.60	27.23	34.98	25.44
3	26.15	27.57	25.20	35.20
5	30.12	37.38	27.21	26.64
7	29.87	26.79	35.20	40.00
9	28.35	27.16	26.83	33.91
15	26.32	26.53	33.90	34.80
30	25.80	24.56	26.83	40.00

Figura 5. Resultados de qPCR para IL-12.

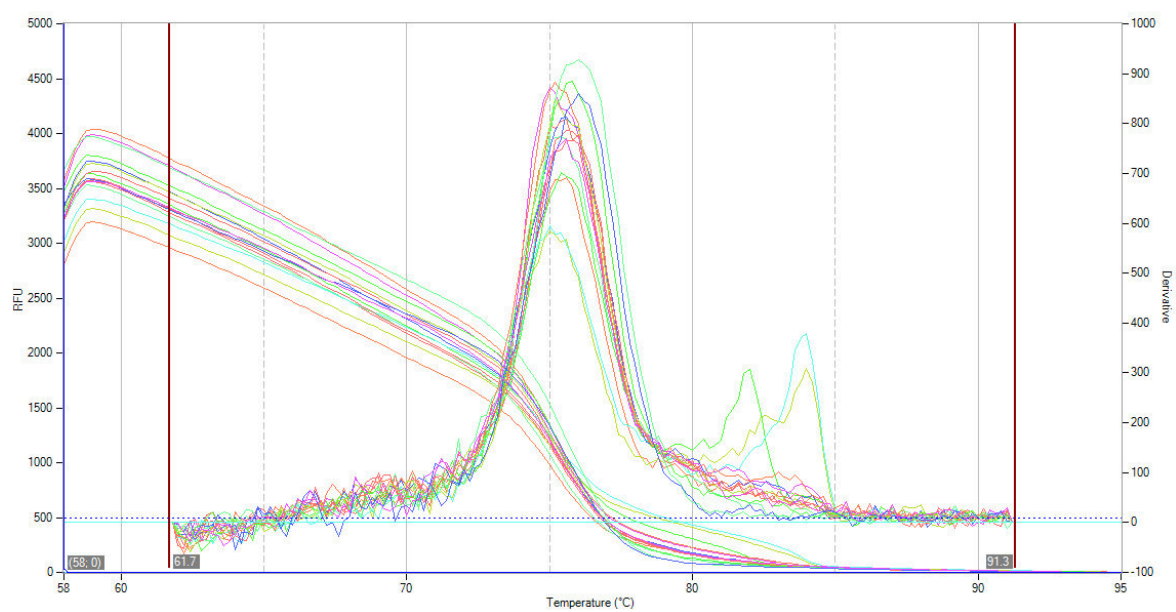
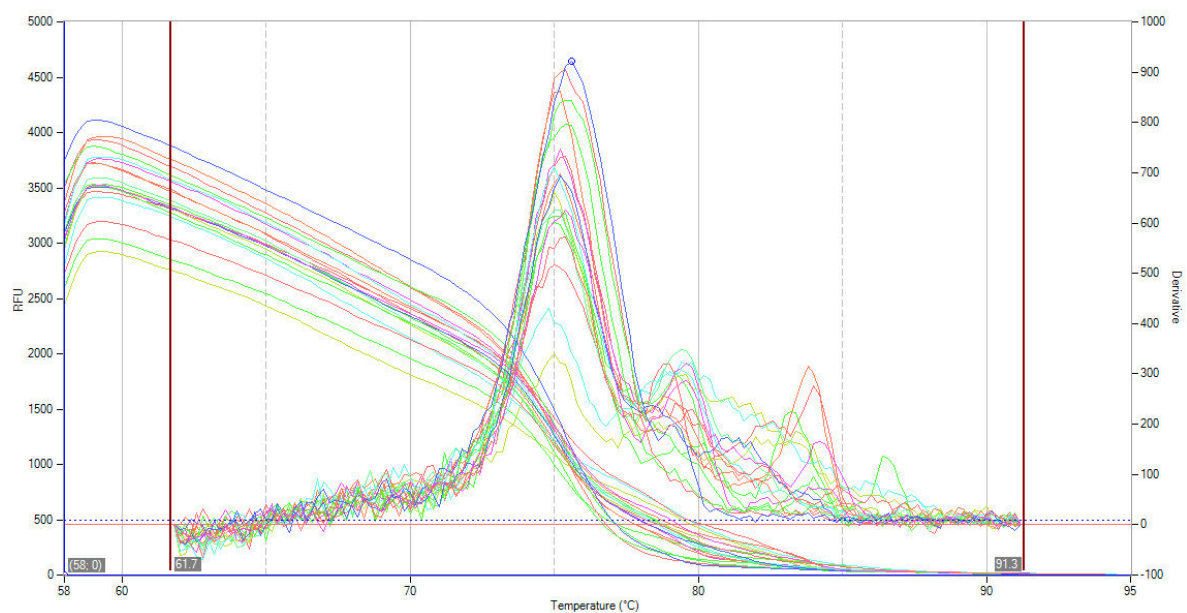


6. Interleucina 4 (IL-4): se evaluaron los perfiles de IL-4 mediante qPCR, mostrando los siguientes resultados:

Cuadro 6. Perfiles de IL-4 según días post-inoculación y poza de procedencia.

GRUPO DIAS	A	B	C	D
0	24.65	29.76	27.74	27.38
1	29.76	27.86	30.21	27.61
3	40.00	40.00	40.00	40.00
5	40.00	40.00	28.20	27.34
7	29.83	40.00	40.00	40.00
9	40.00	26.64	40.00	28.48
15	26.95	26.15	29.30	27.08
30	26.06	25.69	24.99	40.00

Figura 6. Resultados de qPCR para IL-4.

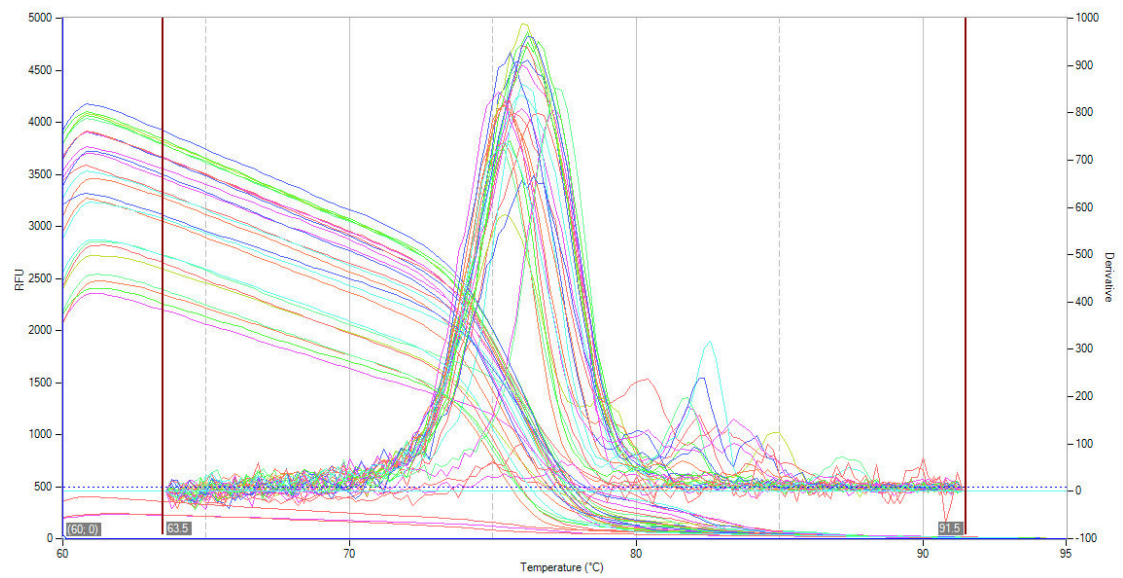
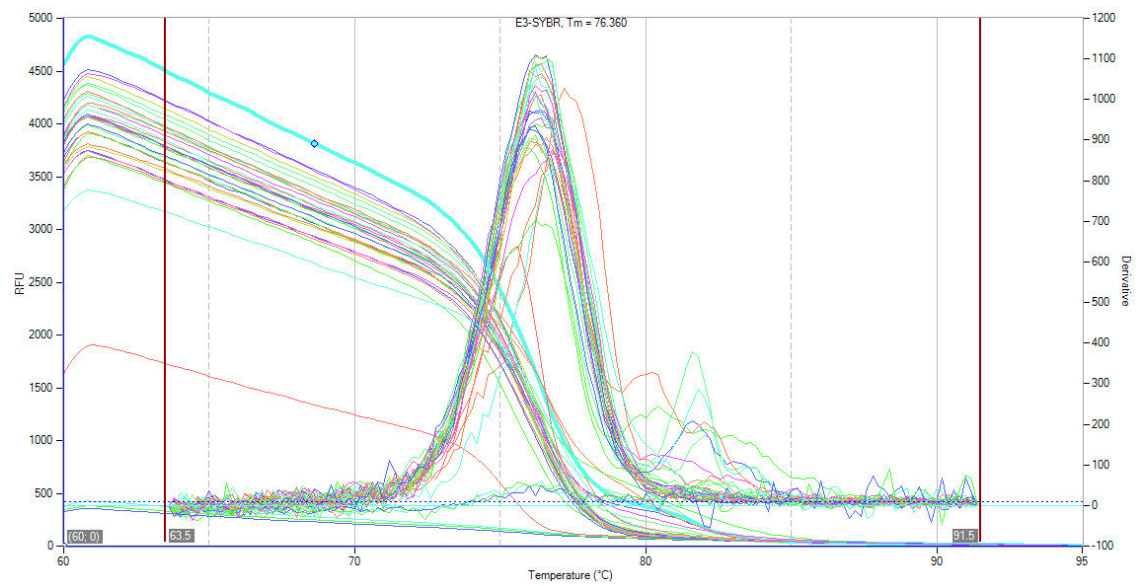


7. Interleucina 10 (IL-10): se evaluaron los perfiles de IL-10 mediante qPCR, mostrando los siguientes resultados:

Cuadro 7. Perfiles de IL-10 según días post-inoculación y poza de procedencia.

GRUPO DIAS	A	B	C	D
0	17.78	22.52	23.35	21.22
1	28.06	22.79	27.72	18.73
3	23.61	21.66	23.18	24.87
5	36.78	17.93	24.09	18.44
7	22.12	19.50	27.00	40.00
9	21.27	16.07	31.50	27.33
15	18.23	28.10	28.75	23.29
30	18.26	40.00	23.38	35.27

Figura 7. Resultados de qPCR para IL-10.

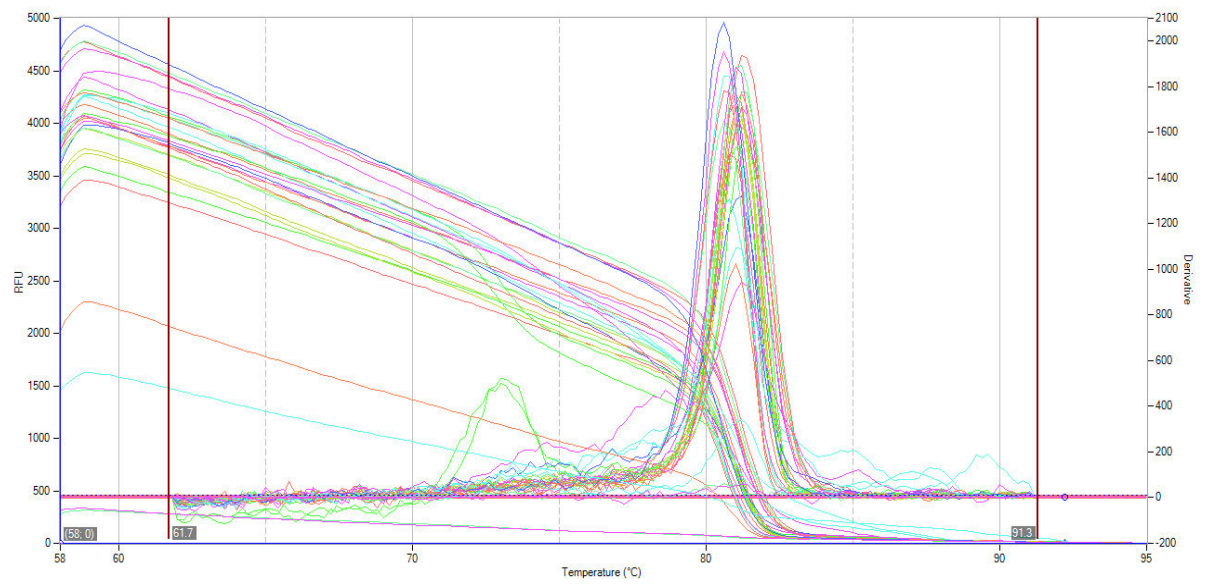
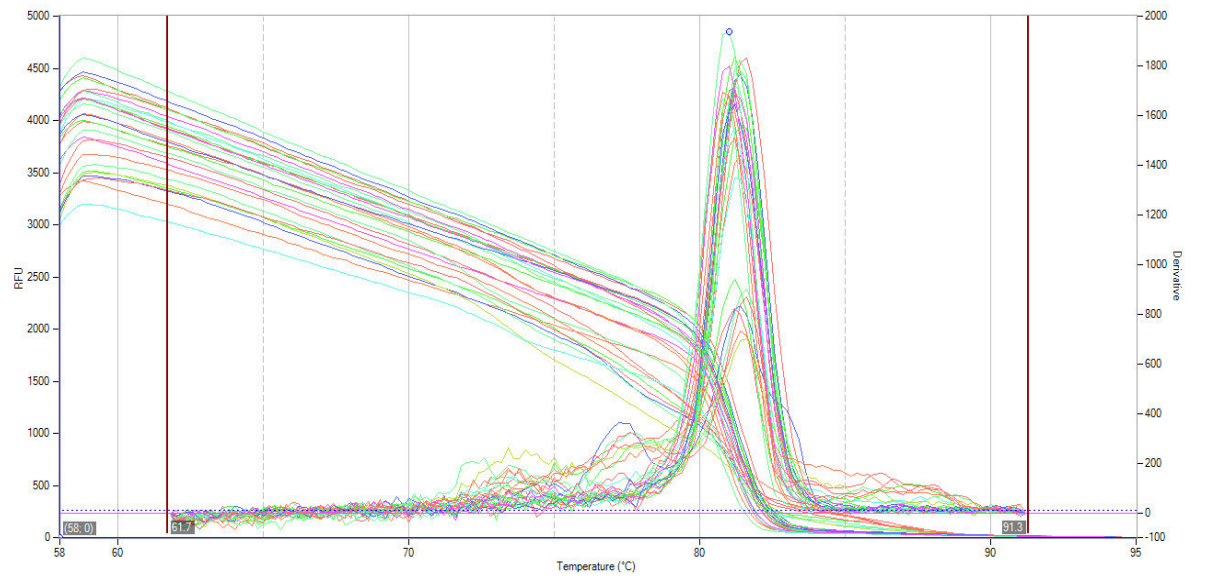


8. Factor de Crecimiento transformante Beta (TGF- β): se evaluaron los perfiles de TGF- β mediante qPCR, mostrando los siguientes resultados:

Cuadro 8. Perfiles de TGF- β según días post-inoculación y poza de procedencia.

GRUPO	DIAS	A	B	C	D
	0	26.29	28.48	24.86	26.54
	1	28.25	28.805	31.31	24.22
	3	28.16	28.26	25.54	31.29
	5	27.76	28.12	27.15	29.05
	7	29.52	33.73	40.00	40.00
	9	40	29.81	22.87	29.65
	15	27.3	29.04	30.88	25.17
	30	28.88	28.5	31.50	31.04

Figura 8. Resultados de qPCR para TGF- β .



9. Interleucina 17 (IL-17): se evaluaron los perfiles de IL-17 mediante qPCR, mostrando los siguientes resultados:

Cuadro 9. Perfiles de IL-17 según días post-inoculación y poza de procedencia.

GRUPO DIAS	A	B	C	D
0	32.64	38.40	32.81	32.72
1	35.38	35.50	38.02	37.63
3	36.52	38.05	32.46	40.00
5	40.00	36.50	34.35	32.81
7	40.00	36.12	40.00	40.00
9	34.14	40.00	40.00	36.79
15	32.35	40.00	36.56	40.00
30	33.63	35.43	40.00	31.07

Figura 9. Resultados de qPCR para IL-17.

